



COLLOQUE
BIOLOGIE SYNTHÉTIQUE
& SYSTÉMIQUE

bio

02 > 04 JUILLET
TOULOUSE

AMPHI FOURIER
INSA DE TOULOUSE

synsys

RENSEIGNEMENTS
& INSCRIPTION

Tél. : +33 (0)5 6155 9538
Mail : gilles.truan@insa-toulouse.fr
<http://biosynsys2014.sciencesconf.org>

SESSIONS

- | Ingénierie des réseaux biologiques et de leur régulation
- | Ingénierie des protéines et des biocatalyseurs
- | Ingénierie métabolique
- | Ingénierie des génomes

| Biologie orthogonale, nanotechnologies, intégration vivant/non-vivant

| Mathématique & modélisation de phénomènes biologiques

| Biologie intégrative

| Ethique et nouveaux enjeux de la Biologie de synthèse



Les comités

Comité d'organisation

- Muriel COCAIGN, LISBP
- Jean-Marie FRANCOIS, LISBP
- Patricia JARRY, SAIC INSA
- Christelle LABRUYERE, LISBP
- Veronique LE BERRE, LISBP
- Pierre MONSAN, TWB
- Isabelle MEYNIAL-SALLES, LISBP
- Denis POMPON, LISBP
- Jean-Charles PORTAIS, LISBP
- Magali REMAUD-SIMEON, LISBP
- Gilles TRUAN, LISBP
- Philippe URBAN, LISBP

Organisme de gestion : SAIC INSA

Comité scientifique

- Alain BLANCHARD, INRA Bordeaux
- Camille DELEBECQUE, Synbio Consulting
- Jean-Loup FAULON, iSSB Evry
- Vincent FROMION, INRA Jouy-en-Josas
- François KEPES, iSSB Evry
- Thierry MAGNIN, Institut Catholique Lyon
- Philippe NOIROT, INRA Jouy-en-Josas
- Philippe SOUCAILLE, LISBP Toulouse
- Gilles TRUAN, LISBP Toulouse
- Jean WEISSENBAACH, Genoscope Evry

Nos partenaires



Programme – mercredi 2 juillet 2014

13h00 – Ouverture du Colloque

Gilles Truan

Conférence Générale

13h15 La longue marche vers la Biologie Synthétique p. 1
Weissenbach Jean

Session Ingénierie des réseaux biologiques et de leur régulation

14h00 The rational design-build-test cycle applied to metabolic pathway engineering p 2
Jean-Loup Faulon

14h25 Programmer le vivant: portes logiques amplificatrices et leurs applications p 3
Jerome Bonnet

14h50 Insights from the operation and modeling of synthetic cell cycles p 4
Damien Coudreuse

15h15 Bacterial translation elicits a growth-rate-dependent, genome-wide and differential production of proteins p
5
Matthieu Jules

15h45 *Pause-Café*

Session Ingénierie des protéines et des Biocatalyseurs

16h15 Associer des domaines catalytiques : mais que fait la Nature? P 6
Gilles Truan

16h40 Neolactines et superlectines : nouveaux outils pour la glycobiochimie de synthèse p 7
Anne Imberty

17h05 Engineering biosynthetic pathways of natural peptide products for producing novel bioactive molecules p
8
Muriel Gondry

17h30 Design and production of artificial repeat proteins as specific binders for protein recognition p9
Anne Chevrel

Conférence Générale

18h00 Présentation du consortium TWB p 10
Olivier Galy

18h20 Une bactérie pour sauver le Canal du Midi - *iGEM* p 11

19h00 *Buffet dinatoire et session posters*

Programme – jeudi 3 juillet 2014

Session Biologie intégrative

- 8h30** Modeling competence regulation during bacterial transformation in *S. pneumonia* p 12
Gwennaële Fichant
- 8h55** Use of large scale epistasis to study a highly complex quantitative trait. p 13
Bertrand Daignan-Fornier
- 9h20** New insights into *Bacillus subtilis* transcription p 14
Etienne Dervyn
- 9h45** Architecture of a bacterial DNA segregation apparatus: active caging of ParB by stochastic self-assembly nucleated from the centromere p 15
Jean-Yves Bouet
- 10h15 *Pause-Café*

Session Ingénierie des génomes

- 10h45** How to build a minimal cell using a mycoplasma chassis? A focus on the translational apparatus *Alain Blanchard* p 16
- 11h05** Sc2.0 : Total Synthesis of the First Eukaryotic Chromosome p 17
Heloise Muller
- 11h25** TALEN for genome engineering p 18
Fabien Delacote
- 11h45** Développement par ingénierie génétique d'un vecteur bactérien vivant atténué pour des applications en immunothérapie des cancers p 19
Bertrand Toussaint
- 12h10** Clonage, Ingénierie de génomes bactériens dans la levure et Transplantation p 20
Carole Lartigue

Conférence Générale

- 12h30** New advances in Gene Synthesis and Codon Optimization p 21
Marc Bruyninx
- 12h45 *Déjeuner*

Session New trends and approaches

- 14h00** Streamlining the *Bacillus subtilis* genome: from proof-of-concept to cell factories p 22
Philippe Noirot
- 14h20** Titre à venir
Camille Delebecque
- 14h40** Protéines en quête de fonction p 24
Marcel Salanoubat

15h00 Development of next-generation biosensors as programmable platforms for medical diagnosis

Alexis Courbet

p 25

15h20 Magnetic control of signaling pathways using nanoparticles

Zoher Gueroui

p 26

15h45 Pause-Café

Session Mathématique & modélisation de phénomènes biologiques

17h05 Resource Balance Analysis: a promising and effective tool for biotechnology *p 27*

Vincent Fromion

17h05 Modeling of the dynamics of bacterial regulatory networks: towards integrated models of the cell

Hidde de Jong

p 28

Conférence Générale

18h00 Projet Chemical Biology and Synthetic Biology *p 29*

Jean-Luc Galzi,

20h30 – Soirée de gala

Programme – vendredi 4 juillet 2014

Session Ingénierie métabolique

- 8h30** Titre à venir p 30
Philippe Soucaille
- 8h50** Direct fermentation for Isobutene, Butadiene and Propylene production: a highway to renewable plastics, synthetic rubber and fuels p 31
Frédéric Pâques
- 9h10** Production d'Acide Glycolique par Fermentation p 32
Wanda Dischert
- 9h30** Rational design, evolution and characterization of an optimized cell factory for the continuous production of 1, 3-propanediol p 33
Isabelle Meynial-Salles
- 9h50** Two molecules of pharmaceutical interest made in yeast: artemisinic acid and hydrocortisone p 34
Marine Bertin
- 10h15 *Pause-Café*

Session Ethique et nouveaux enjeux de la Biologie de synthèse

- 10h45** L'éthique de la biologie de synthèse : « questions disputées » p 35
Thierry Magnin
- 11h20** L'intégrité et l'existence de l'espèce humaine comme normes politiques p 36
Paul-Antoine Miquel
- 11h55** Le vivant entre nature et artifice: une organisation cellulaire suscitée? p 37
Vincent Grégoire-Delory

Conférence Générale

- 12h30** Agilent and Integrative Biology p 38
Nigel Skinner
- 12h50** Présentation du réseau ERA SynBio p 39
Martine Batoux

Session posters

Carole Camarasa	Analyse systématique et ingénierie évolutive de la voie des pentoses-phosphate chez <i>S. cerevisiae</i>	Page 40
Sarah Guiziou	Ingénierie de composants génétiques standardisés pour le contrôle précis et modulable de l'expression des gènes chez <i>Bacillus subtilis</i>	Page 41
Jean-Marie François	System-approach to unravel the true function of TPS system in yeast energetic homeostasis	Page 42
Romain Koszul	meta3C unveils the diversity of chromosome organization in microorganisms	Page 43
Dominique Burnouf	From TPP-riboswitch regulation mechanism to TPP biosynthetic network regulation	Page 44
Sandrine Boschi-Muller	La 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase : une enzyme mitochondriale impliquée dans la production de sulfure d'hydrogène.	Page 45
Charles Gauquelin	Etude structure-fonction de l'hydrogénase à fer de <i>C. acetobutylicum</i> : Développement d'un outil de sélection in vivo d'enzymes modifiées fonctionnelles.	Page 46
Thierry Giardina	CHARACTERIZATION OF β -GALACTOSIDASE AND SUCROSE KINASE ACTIVITIES FROM A HUMAN MICROBIOTA BIFUNCTIONAL ENZYME (AgaSK).	Page 47
Michel Dion	Modélisation moléculaire et ingénierie d'un CBM d'une laminarinase pour la reconnaissance de différents sucres.	Page 48
Andrew Tolonen	La biologie des systèmes de la fermentation cellulosique	Page 49
Lindsay Peyriga	MetaToul Platform - Center of expertise in metabolomics & fluxomics	Page 50
Florian Bellvert	¹³ C-Fluxomic and Isotopic Profiling Powerful tools for metabolism investigation	Page 51
Brice Enjalbert	Attenuation of the post-transcriptional regulator CsrA activity results in a strong G6P stress impairing the growth of <i>Escherichia coli</i> on glucose.	Page 52
Laurence Girbal	Translation regulations play a major role in gene expression in bacteria	Page 53
Muriel Coccagn-Bousquet	Genome-wide regulation of gene expression is controlled by dual role of transcription and transcript stability in bacteria	Page 54
Volker Doring	Systematic substitution of thymine by 5-chlorouracil in the DNA of <i>Escherichia coli</i>	Page 55
Jean-Jacques Toulme	Artificial riboswitches based on RNA-RNA kissing complexes as potential regulator of gene expression.	Page 56
Carole Camarasa	Diversité des flux métabolique chez la levure en fermentation	Page 57
Jean-Pierre Mazat	VIRTUAL MITOCHONDRION A Modular and Multi Level Whole-Mitochondrion Model	Page 58
Adrien Basso-Blandin	GUBS, a compilation framework for synthetic biology using behavioural specification	Page 59
Yves Gendraul	De la microélectronique à la biologie synthétique : vers un flot de conception assisté.	Page 60
Gilles Curien	Towards the virtual chloroplast	Page 61

Hugues Berry	Location-location-location : the importance of space for intracellular cell biochemistry	Page 62
Thomas Lautier	Synthetic-Natural pathways dialogue: Oxysterols pathways conception in yeast	Page 63
Thomas Walther	Ex nihilo Design of a Synthetic Metabolic Pathway for the Production of 2,4-Dihydroxybutyric Acid	Page 64
Bloch Bouzon	Design et installation par évolution dirigée d'une voie alternative de biosynthèse des composés C1 chez Escherichia coli : le cycle du HOB	Page 65
Estelle Grousseau	Cupriavidus necator : plateforme de bioproduction de synthons	Page 66
Myriam Ferro	Development of an absolute and multiplex MS-based quantification method for E. coli carbon central metabolism proteins: a tool to feed dynamic predictive models	Page 67
Marie Carquet	Combinatorial approach for expression level modulation of a multigene pathway: what effects can we really expect?	Page 68
Sylvie Lautru	Biosynthèse de nouveaux analogues de pyrrolamides par biosynthèse combinatoire et mutasynthèse	Page 69
Simon Desbois	Atelier de réflexion : Enjeux sociétaux de la biologie synthétique	Page 70

La longue marche vers la Biologie Synthétique

Weissenbach Jean¹

1 : Génomique métabolique (UMR 8030)

CEACNRS : UMR8030 Université d'Evry-Val d'Essonne

GENOSCOPE, 2 rue Gaston Crémieux 91057 Evry Cedex

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/UMR-8030-de-Genomique-metabolique.html>

La Biologie Synthétique a connu un départ en fanfare dans des pays développés comme les Etats-Unis, le Royaume-Uni etc. Des moyens importants publics et privés ont été consacrés à cette discipline qui s'est propulsée à partir de promesses excessivement optimistes. Sur le plan qualitatif des exploits remarquables ont été accomplis. Sur le plan quantitatif, le vivant s'avère plus ardu à maîtriser. Des réajustements s'avèrent nécessaires. Malgré le retard accumulé et la faiblesse des moyens existants, la France a-t-elle encore une chance dans la course aux succès ? Quelques raisons de rester optimistes seront évoquées.

The rational design-build-test cycle applied to metabolic pathway engineering

Feher Tamas ¹, Carbonell Pablo ¹, Libis Vincent ¹, Faulon Jean-Loup ^{1*}

1 : Institut de biologie systémique et synthétique (ISSB)
Géopole Université d'Evry-Val d'Essonne : EA4527CNRS : FRE3561
5 rue Henri Desbruères F-91030 ÉVRY CEDEX
<http://www.issb.genopole.fr/>

* : Auteur correspondant

Synthetic biology and metabolic engineering have succeeded in the biosynthesis of numerous commodity or high value compounds. Yet, the choice of pathways and enzymes used for such successful applications was many times made ad hoc, or required expert knowledge of the specific biochemical reactions. In order to rationalize this process we have developed the computer-aided design (CAD) tool RetroPath that explores and enumerates metabolic pathways connecting the endogenous metabolites of a chassis cell to a target compound. Namely, our tool queries for target activities the list of enzymes found in metabolic databases based on their annotated and predicted activities. Next, it ranks pathways based on the predicted efficiency of the available enzymes, the toxicity of the intermediate metabolites and the calculated maximum product flux. As an illustration of the power of rational design, RetroPath compiled the top-ranking pathways producing the flavonoid pinocembrin, narrowing down a list of nine million possible enzyme combinations to a number that could be easily assembled and tested. We next constructed twelve top-ranked enzyme combinations, four of which displayed significant yields. The pathways were tested using HPLC as well as fluorescence measurements via biosensors responding to intermediate and final products. One round of metabolic network optimization based on RetroPath output further increased pinocembrin titers 17-fold. In total, 12 out of the 13 enzymes tested in this work displayed a performance that was in accordance with its predicted score. These results validate the ranking function of our CAD tool, and open the way to its utilization in the biosynthesis of novel compounds.

Programmer le vivant: portes logiques amplificatrices et leurs applications.

Bonnet Jerome ¹

1 : Centre de Biochimie Structurale (CBS)
INSERM U1054CNRS UMR5048Universités Montpellier I et II
29, rue de Navacelles 34090 MONTPELLIER
<http://www.cbs.cnrs.fr/spip.php?rubrique80>

Un but majeur de la recherche actuelle en biologie synthétique est de «programmer» le comportement des cellules vivantes pour répondre de façon spécifique a certaines combinaisons de signaux intra- ou extra-cellulaires, avec des applications dans les sciences fondamentales, la santé ou l'environnement. En électronique, les portes logiques permettent de programmer des réponses complexes en utilisant l'algèbre de Boole.

Je présenterai tout d'abord nos résultats recents dans l'ingénierie d'une famille complète de porte logiques fonctionnant en cellules vivantes. Nous avons développé une architecture analogue à un transistor génétique, appelée le transcriptor, qui utilise des sérine intégrases de bactériophages pour contrôler le flux de l'ARN polymérase le long de l'ADN. L'inversion ou l'excision de sequences d'ADN codant pour des terminateurs de transcription modulent le taux de transcription. Nous avons réalisé différentes architectures permettant de remplir toutes les fonctions logiques classiques (AND, OR, NOR, NAND, XOR, XNOR). Les fonctions logiques sont simplement programmées en changeant l'agencement des sites de recombinaison dans la séquence cible. Ce nouveau type de portes logiques est de plus capable d'amplification du signal et de logique séquentielle grace à leur fonction de mémoire, des propriétés utiles dans nombreuses applications comme la bio-détection.

Je présenterai ensuite un travail collaboratif sur l'application de ces portes logiques amplificatrices pour la detection de biomarqueurs pathologiques dans des échantillons cliniques. Je conclurai sur la presentation du projet et des premiers résultats de notre nouvelle équipe, visant a l'ingénierie de la bactérie *Baccillus subtilis* pour le diagnostic medical.

Insights from the operation and modeling of synthetic cell cycles

Coudreuse Damien¹

1 : SyntheCell Team - Institute of Genetics and Development of Rennes

CNRS : UMR6290

2, avenue du Pr. Léon Bernard 35043 Rennes

www.synthecell.org

Proper progression through the cell cycle is fundamental for cellular life. Despite the apparent complexity of the multiple layers regulating its different transitions, the core engine driving the eukaryotic cell cycle is surprisingly simple. Indeed, we find that basic synthetic systems providing controlled CDK (cyclin-dependent kinase) activity levels and bypassing a large part of the endogenous regulatory network can autonomously sustain the entire fission yeast division cycle. Using mathematical modeling, we build on these results and unravel features of the synthetic modules that shed new light on important aspects of the natural cell cycle control circuit. In particular, our work suggests that molecular noise is an integral part of the cell cycle system, and we propose a quantitative origin for the phenomenon of mitotic catastrophe that unexpectedly involves G1 cyclins. Finally, I will introduce how our ongoing studies using synthetic cell cycle modules open new avenues of investigation for understanding fundamental principles in the evolution of cell proliferation.

Bacterial translation elicits a growth-rate-dependent, genome-wide and differential production of proteins

Borkowski Olivier ^{1,2}, Goelzer Anne ², Schaeffer Marc ³, Mäder Ulrike ³, Aymerich Stéphane ¹, Jules Matthieu ^{1*}, Fromion Vincent ^{2*}

1 : MICrobiologie de l'ALimentation au Service de la Santé humaine (MICALIS)

AgroParisTech Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1319

F-78350 JOUY-EN-JOSAS

<http://www.micalis.fr/micalis>

2 : Unité Mathématique Informatique et Génome (MIG)

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UR1077

Bâtiment 233 Domaine de Vilvert 78350 Jouy en Josas Cedex

<http://migale.jouy.inra.fr/mig>

3 : Institute for Microbiology, Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald (EMAU)

17487 Greifswald

* : Auteur correspondant

We revisited the contribution of translation to global mechanisms allowing bacteria to modulate abundance of single proteins with respect to the growth rate. Current theories suggest that translation efficiency (i.e. number of proteins produced per mRNA) remains invariant with increasing growth rate (Klumpp et al., *Cell*, 2009), which is inconsistent with the scanty correlation between mRNAs and cognate proteins abundances at the genome-scale level (Buescher et al., *Science*, 2012; Vogel and Marcotte, *Nat Rev Genet.*, 2012). We tackled this apparent paradox using a systems biology approach.

We developed a knowledge-based, nonlinear mathematical model of bacterial translation. The in-depth analysis of the model led us to experimentally (i-) reassess, using high-throughput and genome-wide technologies, each measurable RNA entity at different growth rates, (ii-) design and evaluate transcription and translation of a series of synthetic reporter strains, and (iii-) develop a model-driven integration of the genome-wide and molecular experimental datasets. In contrast to the current knowledge, the drop in abundance of a constitutively expressed protein with increasing growth rate is not only due to the dilution but also to an unexpected up to 4-fold decrease of translation efficiency. Our model revealed that this drop relies on a drastic decrease in free (untranslating) ribosomes, a non-measurable entity. Using a set of 18 *Bacillus subtilis* strains combining 9 synthetic translation initiation regions (TIRs) and 2 constitutive promoters, we showed (i-) that the variation in free ribosome abundance results in a growth-rate-dependent nonlinear modulation of single proteins and (ii-) that the mechanism relies on the selective titration of the free ribosome fraction by the transcript-specific TIRs. Altogether, our results bring a radically new perspective on the regulation of translation by demonstrating that cells can differentially translate individual transcripts as function of the growth rate without regulators. This mode of regulation is a hard-wired regulatory layer of gene expression, which adapts bacterial physiology to available resources. It also opens novel avenues for synthetic biology in the potential it offers to bypass the need for multiple regulators to modulate complex synthetic circuits.

Associer des domaines catalytiques : mais que fait la Nature?

Frances Oriane ¹, Fatemi Fataneh ¹, Sizun Cristina ¹, Guittet Eric ¹, Pompon Denis ², Perez Javier ³, Lescop Ewen ¹, Truan Gilles ²

1 : Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)

CNRS : UPR2301

Avenue de la terrasse 91198 Gif sur yvette cedex

2 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

CNRS : UMR5504INSA - Institut National des Sciences Appliquées Institut national de la recherche agronomique (INRA)

INSA Toulouse 135 Avenue de Rangueil 31077 Toulouse Cedex 4

www.lisbp.fr

3 : Synchrotron SOLEIL (SSOLEIL)

CNRS : UMRUR1

L'Orme des Merisiers Saint-Aubin - BP 48 91192 GIF-sur-YVETTE CEDEX

<http://www.synchrotron-soleil.fr>

Les analyses de génomes ont révélé que plus de 70% des protéines eucaryotes sont constituées de plusieurs domaines structuraux assemblés en une chaîne polypeptidique unique. Initialement, les fonctions des protéines multidomaines ont été décrites comme la somme des fonctions de chacun des domaines les constituant. L'association de domaines protéiques en une seule protéine présente plusieurs avantages, entre autres: i) la possibilité d'isoler les métabolites et les intermédiaires instables, ii) la promotion d'interactions entre domaines catalysant différentes étapes d'une voie métabolique pour accélérer l'ensemble des réactions, iii) un contrôle direct de la stoechiométrie entre domaines et, iv), la co-localisation cellulaire des domaines. Au sein de ces édifices, l'organisation, l'architecture et la dynamique des domaines catalytiques sont essentiels dans le contrôle de l'activité enzymatique.

En utilisant un modèle de protéine multidomaine, impliquée dans le transfert d'électrons, je montrerai comment la dynamique des domaines influe sur le flux électronique total. Ces résultats pourraient avoir des implications importantes sur le dessin de protéines modulaires contenant des domaines catalytiques individuels.

Neolectines et superlectines : nouveaux outils pour la glycobiologie de synthèse

Imberty Anne¹, Arnaud Julie^{1*}, Audfray Aymeric¹, Römer Winfried²

1 : Centre de recherches sur les macromolécules végétales (CERMAV)

CNRS : UPR5301 Université Joseph Fourier - Grenoble I
601 Rue de la Chimie 38400 ST MARTIN D HERES

<http://www.cermav.cnrs.fr>

2 : Centre for Biological Signalling Studies (BIOSS)

Scha?nzlestra?e 18, Albert-Ludwigs-University Freiburg, 79104 Freiburg

* : Auteur correspondant

Une caractéristique esentielle de toute cellule vivante et la présence du glycocalyx, une couche de glycannes complexes qui joue un rôle crucial dans les phénomènes de reconnaissance et d'adhésion impliquant d'autres cellules ou des microorganismes pathogènes. Les interactions protéine/glycannes sont également impliquées dans l'endocytose de toxines bactériennes, virus ou bacteries.

Les lectines bactériennes présentent une forte affinité pour les oligosaccharides présents sur les tissus humains. Ces protéines sont multivalentes et une première étape d'ingénierie a permis de modifier le nombre de sites de liaison présent sur le fold ?-propeller de la lectine de *Ralstonia solanacearum*, et d'analyser les conséquences sur l'interaction avec des membranes. Dans une deuxième étape, des néolectines ont été produites en concevant un gène permettant un contrôle complet du nombre de sites et de leur localisation. Les interactions avec des vésicules géantes unilamellaires contenant des glycolipides permettent de déterminer les règles de topologie qui dirigent la courbure des membranes et leur invagination.

Ces recherches se poursuivent dans un réseau EraSynBio « Synthetic Glycobiology - new strategies to build and functionalize proto-cells and proto ?tissues » basé sur l'utilisation des interactions lectine-sucre pour la construction de structures complexes.

Engineering biosynthetic pathways of natural peptide products for producing novel bioactive molecules

Jacques Isabelle, Moutiez Mireille, Seguin Jérôme, Favry Emmanuel, Belin Pascal, Gondry Muriel ^{1*}

1 : Institut de Biologie de Saclay (iBiTec-S)

CEA

CEA Saclay Bât. 152 91191 Gif-sur-Yvette

<http://www-dsv.cea.fr/ibitecs/simopro/ltmb/biosynthese>

* : Auteur correspondant

Our research is dedicated to the study of the biosynthetic pathways of peptide natural products with the aim of identifying and developing new pharmacologically valuable compounds. Most of these biologically active peptides are assembled by ribosome-independent mechanisms. Understanding the molecular mechanisms responsible for their biosynthesis opens the way to synthetic biology approaches to generate new «natural nonnatural» peptide products with a great biological relevance.

We are currently studying the biosynthesis of cyclodipeptides and their derivatives, the diketopiperazines (DKPs), which constitute a large class of peptide natural products. Recently, the interest in DKPs has significantly increased because of their diverse and noteworthy bioactivities, such as antibacterial, antitumoral, antifungal, immunosuppressive or antiinflammatory activities.

We identified a novel family of enzymes structurally related to class-I aminoacyl-tRNA synthetases, the cyclodipeptide synthases (CDPSs), that use aminoacyl-tRNAs as substrates for the synthesis of various cyclodipeptides (1-3). CDPSs are associated with cyclodipeptide-tailoring enzymes in biosynthetic pathways dedicated to the synthesis of DKPs (1,4). Five of these biosynthetic pathways have been characterized, highlighting the chemical diversity that could be obtained with the CDPS-dependent biosynthetic pathways.

Genome mining revealed the presence of genes encoding more than 150 putative CDPSs in bacteria, fungi and animals (4). We undertook the characterization of these putative CDPSs to explore the diversity of the cyclodipeptides that they synthesized. In many cases, CDPS genes are clustered with genes encoding cyclodipeptide-tailoring enzymes (4). The characterization of new and versatile cyclodipeptide-synthesizing enzymes and various cyclodipeptide-tailoring enzymes, combined with CDPS engineering, opens up new possibilities for pathway engineering and combinatorial approaches to increase the natural diversity of DKPs and generate novel peptide products with interesting biological properties.

(1) Gondry et al. Nat. Chem. Biol. 2009, 5, 414; (2) Sauguet et al. Nucl. Acids Res. 2011, 39, 4475; (3) Moutiez et al. Nucl. Acids Res. 2014, doi: 10.1093/nar/gku348 ; (4) Belin et al. Nat. Prod. Rep. 2012, 29, 961

Design and production of artificial repeat proteins as specific binders for protein recognition

Chevrel Anne ¹, Urvoas Agathe ¹, Valerio Marielle ¹, Mesneau Agnes ¹, Desmadril Michel ¹,
Minard Philippe ¹

1 : Institut de biochimie et biophysique moléculaire et cellulaire (IBBMC)

CNRS : UMR8619 Université Paris XI - Paris Sud

bat. 430 91405 ORSAY CEDEX

<http://www.u-psud.fr/b-430/ibbmc.nsf>

Immunoglobulin fold is not the only basis for specific recognition molecules. Other adaptive immunity systems exist and many other proteins are also able to mediate specific high-affinity interactions. These are interesting scaffolds to generate alternative binding molecules.

A new family of artificial proteins, named α Rep, based on a thermostable α -helical repeated motif was designed. The repeated motif, first identified in an archae protein of unknown function was refined and idealized using a consensus design strategy. A library of artificial proteins based on this design was then constructed. All proteins from this library have the same general fold but differ both in the number of repeats and in a set of five highly randomized positions per repeat. The randomized side chains are located on the outside surface of the second helix. Sequences from this library are efficiently expressed as soluble, folded and very stable proteins (50-100 mg.mL⁻¹, T_m > 70°C).

Using an optimized phage display library, specific binders with nanomolar affinities for a range of unrelated protein targets have been selected from the library. The crystal structures of three binary complexes of α Reps and their cognate targets were solved and show that specific interaction emerges from the hypervariable side chains clustered together on one face of the protein.

α Rep is now an efficient and generic resource for specific protein binders. In order to develop this promising tool, the expression and binding ability of these disulfide-free proteins was assessed in eukaryotic cells. Using the well-known GFP protein as a model, we showed the ability of the α Reps to recognize and bind specifically their targets into a cytosolic environment. Consequently, α Reps could be used efficiently inside eukaryotic cells as biological tracers or a specific disruptive element to achieve protein interference.

Présentation du consortium TWB

Galy Olivier¹

1 : Toulouse White Biotechnology (TWB)

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR782CNRS : UMR5504

Parc Technologique du Canal 3, rue des Satellites 31400 Toulouse

<http://www.toulouse-white-biotechnology.com>

TOULOUSE WHITE BIOTECHNOLOGY (TWB) est un démonstrateur préindustriel qui conçoit et construit des outils biologiques (enzymes, microorganismes, consortia microbiens...) ouvrant ainsi de nouvelles voies de production de molécules chimiques (synthons), de biopolymères, de biomatériaux, de biocarburants basées sur l'utilisation du carbone renouvelable.

Une bactérie pour sauver le Canal du Midi

Toulouse Igem ^{1*}

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04
* : Auteur correspondant

Les maladies cryptogamiques, d'origine fongique, sont à l'origine de pertes économiques importantes en touchant les plantes agricoles, forestières et ornementales. Certains phytopathogènes conduisent à des trachéomycoses en provoquant la dégénérescence du système vasculaire de la plante. Le Chancre coloré est l'une de ces infections qui touche le Platane (*Platanus Spp.*), arbre bordant le Canal du Midi, dont *Ceratocystis platani* est à l'origine. Le développement d'un traitement de zones contaminées permettrait de remplacer les mesures prophylactiques d'abatage qui ont un coût gigantesque et un impact écologique, touristique et social important. Cette situation d'extrême urgence rend acceptable l'utilisation d'organismes spécifiques designés. Le principe du projet vise à utiliser une bactérie endophyte (*Bacillus subtilis*) capable de détecter in planta le pathogène, le cibler dans le but de délivrer in situ un cocktail de molécules permettant de le détruire, tout en exerçant un contrôle de la dissémination de cette bactérie dans l'environnement.

Modeling competence regulation during bacterial transformation in *S. pneumoniae*

Fichant Gwennaële¹, Weyder Mathias¹, Prudhomme Marc¹, Polard Patrice¹

1 : Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaires (LMGM)

CNRS : UMR5100 Université Paul Sabatier (UPS) - Toulouse III

118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 9

<http://www-lmgm.biotoul.fr/>

Natural genetic transformation is a transient, regulated process developed during a change of the physiological state of the cell, named competence. It proceeds through the internalization, processing and homologous recombination of exogenous DNA. In *S. pneumoniae*, competence is the result of transcription waves of three groups of genes, named early, late, and delayed com genes respectively. In cultures, competence develops abruptly during exponential growth phase in response to a competence-stimulating peptide (CSP) encoded by *comC*, exported and matured by the ComAB exporter. At a critical concentration, extracellular CSP activates the two-component signal transduction system ComDE. ComE~P activates both *comAB* and *comCDE* operons (early com genes), establishing a positive feedback loop, which results in a sudden rise in extracellular CSP levels, rendering all cells in a culture simultaneously competent. ComE~P activates also the competence-specific sigma factor *comX*, which control late com genes coding for exogenous DNA uptake and transforming protein machinery. Shut-off of pneumococcal competence has been shown to be dependent on two mechanisms. First, while ComE~P activates early competence genes, ComE antagonizes their expression. Second, DprA interacts with ComE~P to block ComE-driven transcription. We undertook the modeling of the competence regulatory circuit through ordinary differential equations. The unknown model parameters have been estimated with the Copasi software. Parameters have been fitted against known protein concentrations during competence state. Constraints have been set to ensure that the relative affinities of regulatory proteins for their target regulatory sites were consistent with experimental data. Model was parameterized so that the system is at steady state when the partner stoichiometry is not disturbed. After addition of CSP into the system, competence is induced and the kinetic of the early and late competence genes is consistent with available experimental data. Simulations of gene knock out thought to impair competence are in agreement with experimental observations. The next development will be to include methods enabling the simulation of competence in a multi-cellular environment to understand how the competence extends to the whole population.

Use of large scale epistasis to study a highly complex quantitative trait.

Daignan-Fornier Bertrand¹, Moretto Fabien¹, Tissot-Dupont Jeremy¹, Pinson Benoit¹

1 : IBGC (UMR5095)

CNRS : UMR5095

1, rue Saint-Saens 33077 Bordeaux Cedex

Cell size is a highly complex quantitative trait resulting from interactions between intricate genetic networks and environmental conditions. In yeast more than 400 mutants affecting cell size have been identified. How the corresponding gene-products cooperatively contribute to cell size homeostasis is not known. We have engaged large scale epistasis studies to place these 400 genes into pathways. In a pilot study we were able to characterize a new cell-size homeostasis pathway comprising more than 50 genes including the sirtuin Sir2 and downstream effectors. We showed that this Sir2 signaling route acts independently of previously described cell size controlling pathways and may integrate the metabolic status of the cell through NAD⁺ intracellular concentration. More recently we focused on Whi5 and Cln3, two master regulators of cell size homeostasis and identified more than 60 genes contributing to this pathway. This study shed light on a highly complex genetic network that integrates intricate nutritional information from the environment.

New insights into *Bacillus subtilis* transcription

Dervyn Etienne¹, Nicolas Pierre², Mäder Ulrike³, Becher Dörte³, Fromion Vincent⁴,
Noirot Philippe¹

1 : MICrobiologie de l'ALimentation au Service de la Santé humaine (MICALIS)

AgroParisTech Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1319

F-78350 JOUY-EN-JOSAS

<http://www.micalis.fr/micalis>

2 : Unité de Mathématique, Informatique et Génome (MIG)

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UR1077

MIG - INRA (Bâtiment 233) Domaine de Vilvert 78352 Jouy en Josas Cedex

<http://mig.jouy.inra.fr/>

3 : Ernst-Moritz-Arndt-University Greifswald

D-17489 Greifswald

4 : MIG

Institut national de la recherche agronomique (INRA)

Domaine de Vilvert 78350 Jouy-en-Josas

Recent studies revealed the unsuspected complexity of bacterial transcriptomes. However, assessing the extent of transcriptome plasticity within a bacterial species and how it is remodelled during adaption still remains a challenge. From our previous analysis of the condition-dependent transcriptome of the model bacterium *Bacillus subtilis*, we systematically mapped transcription units under 104 conditions that covered most of this versatile bacterium's lifestyles. Clustering of promoter activities coupled with sigma factor binding motif identification revealed that sigma factor-mediated regulation accounts for 66% of the total variance observed in the transcriptional activity. It also revealed that imperfect control of transcription initiation and termination leads to pervasive antisense transcription.

In an effort to understand global *B. subtilis* transcriptional regulation in tight coupling with mathematical modelling, we are developing approaches i) to identify genes under direct control of target transcription factors; ii) to map transcription start sites (TSS) and transcription termination sites and compare them in various conditions; and iii) to characterize potentially spurious antisense RNAs. These approaches together with the induction of exogenous (therefore spurious) transcription patterns in the cell and monitoring of its evolution in controlled conditions should provide data to model and understand the origin of spurious transcription in the context of global transcription regulation.

Architecture of a bacterial DNA segregation apparatus: active caging of ParB by stochastic self-assembly nucleated from the centromere

Bouet Jean-Yves¹, Sanchez Aurore¹, Cattoni Diego², Walter Jean-Charles³, Nollmann Marcelo², Parmeggiani Andrea³, Rech Jérôme¹, Gasc Cyrielle¹

1 : Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaires (LMGM)

CNRS : UMR5100 Université Paul Sabatier (UPS) - Toulouse III

118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 9

<http://www-lmgm.biotoul.fr/>

2 : Centre de Biochimie Structurale (CBS)

Inserm : U1054 Université Montpellier II - Sciences et techniques CNRS : UMR5048 Université Montpellier I

29 rue de Navacelles 34090 MONTPELLIER Cedex - France

<http://www.cbs.cnrs.fr/spip.php?rubrique80>

3 : Laboratoire Charles Coulomb (L2C)

Université Montpellier II - Sciences et techniques CNRS : UMR5221

1 place Eugène Bataillon Université Montpellier II 34095 Montpellier Cedex 5

<http://www.coulomb.univ-montp2.fr>

In all living cells the genetic material has to be faithfully segregated to daughter cells at the onset of cell division. In bacteria this process is ensured by minimalistic machineries encoded by partition loci, namely Par. The ParA-type partition system is the most widespread, present on the vast majority of low-copy number plasmids, and the only present on chromosome. It is composed of only three essential elements, a centromere site, a centromere binding protein, and a motor ATPase, generically called parS, ParB, and ParA, respectively.

The assembly of a nucleoprotein complex on centromere DNA sequences is the first step in the active partition process that ensures an active bi-directional segregation of DNA molecules. Formation of a partition complex by binding of ParB proteins to the centromere enables non-specific binding of ParB to neighboring DNA, leading to the establishment of an extended partition complex. The overall architecture of such extended partition complex is not known for any ParA-type partition system.

Using superresolution imaging (PALM), we revealed the intracellular localization of ParB molecules at the single molecule level. In addition, we combined biochemical approaches with physico-mathematical modeling of high resolution ChIP-sequencing data to examine the propagation mode of ParB in the vicinity of the centromere. Collectively, our data suggest a novel mechanism for ParB assembly from the centromere to surrounding DNA, in which ParB dimer-dimer and ParB-DNA interactions maintain SopB in clusters of very high concentration. In this model, ParB propagation by stochastic binding along the DNA adjacent to the centromere organizes the partition complex in a dynamic architecture. Since all ParBs studied to date share this propagation property, such organization may be a general theme for the architecture of all ParA-type partition systems.

How to build a minimal cell using a mycoplasma chassis? A focus on the translational apparatus.

Blanchard Alain^{1,2}

1 : Biologie du fruit et pathologie (BFP)

Université Sciences et Technologies - Bordeaux I *Université Victor Segalen - Bordeaux III* *Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1332* *Université de Bordeaux (Bordeaux, France)*

Centre INRA Bordeaux-Aquitaine 71 avenue Bourlaux BP81 F-33883 Villenave d'Ornon

<http://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/bfp>

2 : Université de Bordeaux

Université de Bordeaux (Bordeaux, France)

146 rue Léo Saignat - 33076 Bordeaux cedex

Mollicutes is a class of bacteria that have evolved from a common Firmicutes ancestor mostly by massive genome reduction. With genomes under 1 Mbp in size, Mollicutes species belonging to the Mycoplasma genus retain the capacity to replicate and grow autonomously. They are considered as the best representatives of a minimal cell. Engineering a minimal cell using a mycoplasma chassis requires not only the development of new methods for genome engineering but also the identification of a minimal set of genes for life. Investigators from the C. Venter Institute have greatly contributed to the development of synthetic biology tools including the cloning of mycoplasma genome in yeast, the transplantation of these genomes back in mycoplasma recipient cells and the assembly of large DNA fragment from synthetic DNA fragments [1]. Combined omics approaches have resulted in a large set of data available for *M. pneumoniae* and *M. genitalium* resulting in advanced in silico models. Recently, we have identified the minimal set of proteins that can sustain ribosome biogenesis and translation of the genetic code in these bacteria [2]. Using the experimentally validated genes from the model bacteria *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* as input, genes encoding proteins of the core translation machinery were predicted in 39 distinct Mollicutes species. A core set of 104 of these proteins is found in all species analyzed. As expected, genes coding for aminoacyl-tRNA synthetases, ribosomal proteins and initiation, elongation and termination factors are the most persistent (i.e. conserved in a majority of genomes). Reconstruction of genome evolution in Mollicutes revealed that, beside many gene losses, occasional gains by horizontal gene transfer also occurred. This analysis not only showed that slightly different solutions for preserving a functional, albeit minimal, protein synthesizing machinery have emerged in these successive rounds of reductive evolution but also has broad implications in guiding the reconstruction of a minimal cell by synthetic biology approaches.

Montague MG, Lartigue C, Vashee S. (2012). *Curr Opin Biotechnol.* 23(5):659-65. Grosjean H, Breton M, Sirand-Pugnet P, Tardy F, Thiaucourt F, Citti C, Barré A, Yoshizawa S, Fourmy D, de Crécy-Lagard V, Blanchard A. (2014). *PLoS Genet.* 10(5):e1004363.

Sc2.0 : Total Synthesis of the First Eukaryotic Chromosome

Muller Heloise¹

1 : Institut Pasteur (IP)

CNRS : UMR3525

25-28 rue du Docteur Roux 75015 Paris

Rapid advances in DNA synthesis techniques have made it possible to engineer viruses, biochemical pathways and assemble bacterial genomes. We report the synthesis of a functional 272,871 bp eukaryotic chromosome, synIII, which is based on the 316,617 bp native *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III. Changes to synIII include TAG/TAA stop-codon replacements, deletion of subtelomeric regions, introns, tRNAs, transposons and silent mating loci as well as insertion of loxP sites to enable genome scrambling. The total synthesis of synIII represents the first complete design and synthesis of a eukaryotic chromosome, establishing *S. cerevisiae* as the basis for designer eukaryotic genome biology.

TALEN for genome engineering

Delacote Fabien¹

1 : Collectis bioresearch (Collectis bioresearch)

CELLECTIS

8 rue de la Croix Jarry 75013 Paris

<http://www.collectis-bioresearch.com/>

The possibility to disrupt cellular functions through accurate and easy addition, removal, or exchange of DNA sequences directly in cellular genomes, together with the advances in, and access to, genome sequencing and epigenetic information, currently opens exciting perspectives in numerous fields such as biology, biotechnology and medicine.

Over the last few years the TALEN nuclease has proven to be an incredibly robust and efficient tool for genome engineering. Based on our nuclease activity assays, we present how we can address the specificity of a TALEN, their accessibility to methylated loci and how we can predict TALEN-induced mutations. We illustrate the use of TALEN tools for different applications implying Non Homologous End Joining pathway for knock-out, and Homologous Recombination for gene tagging and nucleotide substitution.

Développement par ingénierie génétique d'un vecteur bactérien vivant atténué pour des applications en immunothérapie des cancers

Le Gouellec Audrey, Polack Benoit, Toussaint Bertrand ^{1,2*}

- 1 : Techniques de l'Ingénierie Médicale et de la Complexité - Informatique, Mathématiques et Applications, Grenoble (TIMC-IMAG)
CNRS : UMR5525 Université Joseph Fourier - Grenoble I
Domaine de la Merci - 38706 La Tronche
<http://www-timc.imag.fr>
- 2 : Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble (CHU)
CHU Grenoble
38000 - GRENOBLE
- * : Auteur correspondant

La bactérie *Pseudomonas aeruginosa* possède un appareil naturel d'injection de toxines protéiques à l'intérieur des cellules, entre autres de l'immunité. Ce système de sécrétion de type 3 (SST3) est assimilé à une seringue naturelle dont nous avons détourné la fonction initiale pour des applications d'immunothérapie. Dans un premier temps, un asservissement de l'expression du SST3 a été développé sur la base de nos études du réseau de régulation de l'expression des gènes du SST3. Les gènes codant les toxines naturelles de la bactérie ont été invalidés. Un plasmide permettant la production d'une protéine antigénique d'intérêt fusionnée à une séquence d'adressage permettant la sécrétion/injection par le SST3 a été construit. Différentes stratégies d'atténuation de la bactérie ont été explorées comme l'invalidation de gènes de virulence ou l'obtention de bactéries mortes mais métaboliquement actives. Des essais sur des modèles de cancers chez la souris ont montré l'efficacité et la sécurité d'utilisation de ce vecteur. Des applications en clinique humaine sur des cancers induits par des virus sont en cours de développement en partenariat avec la société APCure SA qui possède un droit exclusif d'exploitation des deux brevets protégeant cette technologie.

Clonage, Ingénierie de génomes bactériens dans la levure et Transplantation

Lartigue Carole ¹

1 : Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique *Ministère de l'alimentation de l'agriculture et de la pêche*
Institut de Biologie Végétale Moléculaire UMR 1332 Biologie du fruit et Pathologie (BFP) 71 Avenue Edouard Bourlaux,
CS 20032 33882 VILLENAVE D'ORNON CEDEX

Au cours des dernières années, des méthodologies de Biologie de Synthèse (BS) ont émergé. Le travail mené au J. C. Venter Institute a largement contribué à leur essor, en montrant notamment: (1) la synthèse de génome bactérien complet à partir d'oligonucléotides de synthèse, (2) l'ingénierie de génomes bactérien en utilisant la levure comme plate-forme, (3) et la transplantation de génome bactérien isolé d'une cellule bactérienne, directement ou avec la levure comme intermédiaire. Dans ces travaux princeps, les espèces voisines *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Mcap) et *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* (Mmc), ont été respectivement utilisées comme espèces receveuse et donneuse de génome. Ces mycoplasmes, qui appartiennent à la classe Mollicutes, sont dotés de petits génomes (~ 1 Mpb), et utilisent un code génétique différent du code génétique universel. Si ce travail constitue une réelle avancée, sa portée à long terme nécessite d'adapter les méthodologies à d'autres bactéries d'intérêt médical, vétérinaire, biotechnologique ou agronomique.

Un objectif de notre laboratoire est d'élargir les technologies de transplantation et d'ingénierie de génome à de nouvelles espèces de Mollicutes afin de mettre en place des « plateformes génomiques » qui puissent ultérieurement être utilisées pour la recherche voire pour des applications biotechnologiques. En effet, ces bactéries, dites minimales, comportent plusieurs espèces pathogènes chez l'homme, les animaux et les plantes et un des facteurs limitant l'étude du fonctionnement de ces cellules et de leur pouvoir pathogène est le manque d'outils génétiques. Dans la mesure où de nombreux génomes bactériens ont désormais été clonés dans la levure et les techniques d'assemblage de grands fragments d'ADN sont en expansion, la limite principale des techniques de BS décrites ci-dessus reste notre capacité à étendre la transplantation de génomes à de nouvelles espèces bactériennes. Les premiers résultats obtenus au laboratoire montrent que la proximité phylogénétique entre cellules donneuses et receveuses est un paramètre essentiel mais pas suffisant. En effet, des facteurs intrinsèques à certaines espèces, et toujours pas identifiés, se sont révélés être des barrières à la transplantation de génome entre espèces bactériennes phylogénétiquement proches.

New advances in Gene Synthesis and Codon Optimization

Bruyninx Marc ¹

1 : Eurofins

industriel

Z.A.1 de Courtaboeuf 9 Avenue de Laponie 91978 Les Ulis Cedex

Le séminaire proposera tout d'abord une brève introduction sur l'origine des gènes synthétiques, leur méthode de fabrication et leurs principales applications. Il se focalisera ensuite sur l'optimisation de séquences et l'adaptation à l'usage des codons. Les différents algorithmes d'optimisation seront décrits en détails, avec leurs avantages et inconvénients respectifs. Nous présenterons également le programme GENEius développé par Eurofins Genomics et démontrerons son efficacité lors d'une optimisation du gène GFP de Jelly Fish pour une expression chez E.coli.

Streamlining the *Bacillus subtilis* genome: from proof-of-concept to cell factories

Tanaka Kosei ¹, Mangan Michael ¹, Consortium The Basynthec, Henry Christopher S. ²,
Noirot Philippe ¹

1 : MICrobiologie de l'ALimentation au Service de la Santé humaine (MICALIS)

AgroParisTech Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1319

F-78350 JOUY-EN-JOSAS

<http://www.micalis.fr/micalis>

2 : Mathematics and Computer Science Department

Argonne National Laboratory

A repertoire of the chromosome regions dispensable for growth, which covered ~76% of the genome, was established for a variety of media conditions (Tanaka et al., 2013). These data were used to refine a large-scale metabolic model, considerably improving its accuracy at predicting loss of viability. In the EU-funded BaSynthec project, we used this repertoire to minimize the *B. subtilis* genome. Our strategy did not focus on maintaining cell physiology and growth but rather on removing every gene not essential for growth or deletion making. Altogether, 30 deletions from the repertoire were combined sequentially, representing a 35% reduction of the genome. The poor growth of reduced strains can be restored by directed evolution and by restoring appropriate functions. This strategy enables to streamline the *B. subtilis* genome «à la carte» and to build chassis strains for biotechnology applications.

BaSynthec consortium : Stéphane Aymerich¹, Hector Bautista¹, Katrine Bych³, Dörte Becher⁴, Bastien Chevreux⁵, Victor Chubukov⁶, Emma L. Denham⁷, Frederic Escartin¹, Vincent Fromion⁸, Anne Goelzer⁸, Ines Gruner⁵, Matthieu Jules¹, Ulrike Mäder⁴, Ruben A.T. Mars⁷, Pierre Nicolas⁸, Allan K. Nielsen³, Zoltan Pragai⁵, Eric Prestel¹, Sekkhar Ramakrishnan⁹, Michael D. Rasmussen³, Bernd Rinn⁹, Uwe Sauer⁶, Rick L. Stevens², Jan Maarten van Dijk⁷.

¹ INRA, UMR1319 Micalis, AgroParisTech, F-78350 Jouy-en-Josas, France

² Mathematics and Computer Science Department, Argonne National Laboratory, Argonne, USA

³ Novozymes A/S, Kroghvej 36, 2880 Bagsvaerd, Denmark.

⁴ Institute for Microbiology, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, D-17489 Greifswald, Germany.

⁵ DSM Nutritional Products Ltd, Nutrition Innovation Center, R&D Process (NIC-RD/P) CH-4002 Basel, Switzerland.

⁶ Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland.

⁷ Department of Medical Microbiology, University of Groningen and University Medical Center Groningen, 9700 RB Groningen, Netherlands.

⁸ INRA, Mathématique Informatique et Génome UR1077, 78350 Jouy-en-Josas, France.

⁹ Center for Information Sciences and Databases, Department of Biosystems Science and Engineering, ETH Zurich, 4058 Basel, Switzerland.

Titre à venir

Delebecque Camille ^{1*}

1 : SynBio Consulting

Autre

info@synbioconsulting.com

* : Auteur correspondant

Résumé non encore communiqué

Protéines en quête de fonction

Bastard Karine ¹, Smith Alexander ¹, Vergne-Vaxelaire Carine ¹, Médigue Claudine ¹,
Weissenbach Jean ¹, Artiguenave Francois ¹, De Berardinis Veronique ¹, Vallenet David ¹,
Salanoubat Marcel ¹

1 : CEA/IG/Genoscope-UMR 8030 Génomique Métabolique

CEA

Genoscope-Centre National de Séquençage 2, rue Gaston Crémieux CP5706 91057 EVRY Cedex

L'accumulation de donnée de séquençage à un rythme vertigineux a imposé l'annotation de fonctions par des méthodes automatiques sans expertise humaine. Les algorithmes de prédiction de fonction, bien qu'en perpétuelle amélioration, ne permettent pas de prédire avec fiabilité la fonction des gènes. Ils sont néanmoins suffisamment efficaces pour guider un travail expérimental. Dans ce contexte, nous avons développé une stratégie pour découvrir les multiples activités enzymatiques catalysées chez des familles de protéines de fonction inconnue ou avec un petit nombre de fonctions associées. Cette approche est basée sur la définition d'une réaction générique conservée chez la famille, un ciblage enzymatique à haut débit sur des représentants, des investigations structurales et l'analyse de contextes génomiques et métaboliques. Nous avons appliqué cette stratégie à une famille Pfam de fonction inconnue et découvert 14 nouvelles activités enzymatiques. De plus nous avons proposé un rôle métabolique pour certaines de ces enzymes et trouvé des résidus clés pouvant guider une annotation fonctionnelle. L'extension de cette stratégie à d'autres familles d'enzymes, satisfaisant quelques prérequis, permettra d'explorer plus avant la diversité fonctionnelle cachée des enzymes.

Development of next-generation biosensors as programmable platforms for medical diagnosis

Courbet Alexis¹, Bonnet Jerome^{2*}, Endy Drew³, Molina Franck,^{*}

1 : Sysdiag-Modélisation et Ingénierie des Systèmes Complexes Biologiques pour le Diagnostic (Sysdiag)

CNRS : UMR3145BIO-RAD

CAP DELTA 1682 Rue de la Valsiere CS 61003 34184 Montpellier CEDEX 4

<http://www.sysdiag.cnrs.fr/>

2 : Centre de Biochimie Structurale (CBS)

Inserm : U1054Université Montpellier II - Sciences et techniquesCNRS : UMR5048Université Montpellier I

29 rue de Navacelles 34090 MONTPELLIER Cedex - France

<http://www.cbs.cnrs.fr/spip.php?rubrique80>

3 : Department of Bioengineering

318 Campus Drive Clark Center Room S170 Stanford, CA 94305-5444 bioengineering@stanford.edu

<http://bioengineering.stanford.edu/>

* : Auteur correspondant

Longer life expectancy and an increasing number of risk factors lead to a global increase in infectious and cardiovascular diseases, cancers, and diabetes. Early diagnostics and a systematic screening of populations at risk are often required. To be reliable, medical diagnostics must often be based on a pattern of biomarkers, increasing the complexity and the cost of the test, and therefore limiting its widespread deployment. Thus, medical diagnosis has remained a major problem in medical sciences, in a context of medical evolution, clinicians' information overload, technological imperatives, constraints of cost, laboratory capacity and resources. The emergence of personalized medicine favors a new generation of inexpensive portable, miniaturized, multiplexed and less-invasive sensors, integrating factors of assay sensitivity, selectivity, and versatility. Meanwhile, synthetic biology has yielded tools and strategies for the reliable and systematic engineering of biological systems to tackle real world issues. The emergence of synthetic biology is of great interest for the development of innovative biodiagnostic technologies and biosensor approaches for the detection of clinical biomarkers. Synthetic biological parts and devices can be used to design a new era of robust, smart biosensing systems to be used in medical setting. We propose that this strategy could improve the analytical performance of biosensors and to make them suitable for integration into deployable and «ready to use» expert devices.

Magnetic control of signaling pathways using nanoparticles

Gueroui Zoher¹

1 : Ecole Normale Supérieure, departement de chimie (ENS)

Ecole Normale Supérieure de Paris - ENS Paris

24 rue Lhomond, Paris

<http://www.chimie.ens.fr/>

Cell fate decisions and cellular functions are dictated by the spatiotemporal dynamics of molecular signaling networks. However, the techniques available to examine the spatiotemporal characteristics of these intracellular processes remain limited. Here we report a method to artificially control in space and time such signaling pathways using magnetic nanoparticles conjugated to key regulatory proteins. Using a magnetic field, we modulate the collective behavior of GTPase signaling proteins involved in specifying the morphogenetic properties of the cell's cytoskeleton. This allows us to design a bio-inspired switch that triggers microtubule nucleation and stabilization. This method demonstrates how bioactive nanoparticles can be used to engineer both signaling networks and spatial self-organization.

Hoffmann C, Mazari E, Lallet S, Leborgne R, Marchi V, Gosse C, Gueroui Z. Spatiotemporal control of microtubule nucleation and assembly using magnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnol.*, 2013. 8.199-205.

Bonnemay L, Hostachy S, Hoffmann C, Gautier J, Gueroui Z. Engineering Spatial Gradients of Signaling Proteins Using Magnetic Nanoparticles. *Nano Letters*. 2013. 13, 5147-52.

Hoffmann C, Mazari E, Gosse C, Bonnemay L, Hostachy S, Gautier J, Gueroui Z. Magnetic Control of Protein Spatial Patterning to Direct Microtubule Self-Assembly. *ACS Nano*. 2013, 26, 9647-54.

Resource Balance Analysis: a promising and effective tool for biotechnology

Fromion Vincent ^{1*}

1 : MIG

Institut national de la recherche agronomique (INRA)
Domaine de Vilvert 78350 Jouy-en-Josas

* : Auteur correspondant

Understanding the optimality principles underlying resource allocation is the cornerstone for rational re-engineering of living cells. We have proposed in [Goelzer et al, Automatica 2011], a promising theoretical framework, so-called Resource Balance Analysis (RBA) formalizing the problem of resource repartition at the cell scale as a convex optimization problem.

In this talk, we present the biological validation of this theoretical framework by applying it on the Gram-positive model bacterium *Bacillus subtilis*. To this end, through the European Project BasynTech, we have generated a dedicated and large fluxomic and proteomic datasets for grown in various conditions. We have used these data to calibrate/validate our RBA method leading to successful identification of over 600 parameters, including estimated activities of individual enzymes under various conditions.

We then show in this talk that calibrated RBA predicted accurately and quantitatively the allocation of resources between 72 cellular processes in a new condition. Based on our in silico framework, we inferred suboptimal pathways (expressed above cellular demand) and validated experimentally that inactivation of some of these pathways entailed increased growth rate under appropriate conditions.

Finally, we simulated the optimized production of an extracellular enzyme and found that RBA intrinsically captures the continuous rerouting of resources from biomass production towards excretion of the target protein while including implicit operating costs such as the cellular volume occupied by the protein, the resources required for proper folding and secretion, and the requirements of cofactors, vitamins, and metals for protein activity. These findings open new perspectives in the model-driven design of strains for biotechnology.

This work was performed by the following authors:

A. Goelzer¹, J. Muntel², V. Chubukov³, M. Jules⁴, E. Prestel⁴, R. Nölker², M. Mariadassou¹, S. Aymerich⁴, M. Hecker², P. Noirot⁴, D. Becher², and Vincent Fromion¹.

¹INRA, UR1077, Mathématique Informatique et Génome, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

²Institute for Microbiology, Ernst-Moritz-Arndt University Greifswald, D-17489 Greifswald, Germany.

³Institute of Molecular Systems Biology, ETH Zurich, 8093 Zurich, Switzerland.

⁴INRA/AgroParisTech, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France.

Modeling of the dynamics of bacterial regulatory networks: towards integrated models of the cell

De Jong Hidde¹

1 : IBIS (INRIA Grenoble Rhône-Alpes)

Institut Jean Roget CNRS : UMR5163 Université Joseph Fourier - Grenoble II Laboratoire Adaptation et Pathogénie des Microorganismes INRIA

655 avenue de l'Europe, Montbonnot, 38334 Saint Ismier CEDEX, France

<http://ibis.inrialpes.fr/>

Bacteria are capable of rapidly adapting their physiology in response to changes in their environment. The adaptive responses are coordinated by regulatory networks controlling metabolisms, gene expression, replication, and other major functions of the cell. In recent years, mathematical models describing these complex regulatory systems have been developed and enabled new insights into the functioning of the bacterial cell. While some of the modeling efforts strive at including as much molecular detail as possible, others provide a coarse-grained picture of the regulatory networks and the cellular functions they control. I will review these efforts, by means of a few examples, and discuss open issues.

Projet Chemical Biology and Synthetic Biology

Galzi Jean-Luc¹

1 : Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS)
Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg université de Strasbourg
300 boulevard Sebastien Brant, CS 10413, F - 67412 Illkirch

Présentation d'un nouveau projet associant Chemical Biology, Biologie de Synthèse et Biologie des Systèmes

Titre à venir

Souaille Philippe ^{1*}

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

* : Auteur correspondant

Résumé non disponible

Direct fermentation for Isobutene, Butadiene and Propylene production: a highway to renewable plastics, synthetic rubber and fuels

Paques Frédéric ¹

1 : Global Bioenergies

Industrielle

5 rue Henri Desbruères 91000 Evry

www.global-bioenergies.com

The purpose of Global Bioenergies, is to develop innovative metabolic pathways for the production of light olefins from renewable resources, by direct fermentation. Light olefins (ethylene, propylene, linear butylene, isobutylene and butadiene) are the core of the petrochemical industry. The recent use of large quantities of shale gas in steam crackers, resulting mostly in the production of ethylene, has changed the market landscape, emphasizing the need for alternative production routes for the other olefins. However, light olefins are not naturally produced by microorganisms and no bioprocess to convert renewable resources to these molecules has been industrialized so far. Global Bioenergies has developed an artificial metabolic pathway including all the necessary enzymatic reactions from feedstock to isobutene. In contrast with most former approaches, the metabolic route leading to isobutene includes non-naturally occurring reactions as key steps, for example the decarboxylation of hydroxyisovaleric acid into isobutene. Since all these reactions are enzymatic, isobutene can be obtained by direct fermentation, e.g. a process wherein all the chemical transformations are carried on by the host microorganism. The scale-up of this process is in progress. Importantly, production of a volatile compound such as isobutene (and other light olefins) by direct fermentation presents two major advantages: first, the product is spontaneously removed from the culture broth, which alleviates the limitations linked with titer issues. Second, the purification process is considerably easier and cheaper since no energy consuming methods such as distillation or phase separation are necessary to purify the end product. Scale-up will be carried out in two industrial pilots. A first pilot installed in Pomacle-Bazancourt in France with an annual capacity of 10 tons of oxidation-grade isobutene will target applications such as methacrylic acid (a paint additive) and organic glass. The second pilot, installed on the refinery site of Leuna, Germany, will have an annual capacity of 100 tons of polymer-grade isobutene compatible with the rest of isobutene's wide product tree including fuels and rubber applications.

Production d'Acide Glycolique par Fermentation

Dischert Wanda ¹

1 : METabolic EXplorer

Industrie

Biopôle Clermont-Limagne 63360 St Beauzire

Créée en 1999, METabolic EXplorer est une entreprise de chimie biologique, basée à Clermont-Ferrand. Elle développe des solutions industrielles utilisant une large gamme de ressources renouvelables pour pallier des techniques de chimie classique basées sur les ressources fossiles, lourdes et coûteuses. C'est dans ce but qu'en 2006 METabolic EXplorer a initié le projet de développement d'un procédé de production à fort rendement de l'acide glycolique à partir de glucose, pour l'industrie des plastiques biosourcés et cela dans le cadre dans le cadre du programme de «bio raffinerie végétale» BioHub?, financé par OSEO (maintenant BPI France).

Ce composé est actuellement utilisé dans des produits de nettoyage, en cosmétique ou encore pour équilibrer l'acidité de formulations industrielles. C'est surtout un composant essentiel à la fabrication de plastiques issus de matières premières agricoles.

La production biologique d'acide glycolique à partir de glucose nécessite la formation de glyoxylate qui est réduit en glycolate par l'action d'une glyoxylate réductase dépendante du NAPDH. Le glyoxylate est un intermédiaire du cycle de Krebs qui a été modifié chez *Escherichia coli* pour optimiser la production d'AG. Plusieurs autres stratégies d'ingénierie métabolique ont été réalisées pour aboutir à une souche présentant des rendements, titres et productivités élevés.

Rational design, evolution and characterization of an optimized cell factory for the continuous production of 1,3-propanediol

Meynial-Salles Isabelle¹, Tian Liang, Gai Claudia, Thomas Daniel, Soucaille Philippe¹

¹ : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

Adaptative evolution has been widely used to increase the biotechnological production of desired chemicals, but the detailed mechanism and principles of this adaptive response is generally poorly understood at the genetic, biochemical, and metabolic levels. Here, the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol pathway and the B12-independent *Clostridium butyricum* 1,3-propanediol pathway were introduced into *Escherichia coli*, and its central metabolic network was restructured to couple the production of 1,3-propanediol (1,3-PD) to the growth of the microorganism. This modified *E. coli* strain was grown in conditions favoring adaptive evolution for approximately 1000 hours. An evolved population was selected under optimal conditions in a glucose mineral medium. Compared to the original strain, the evolved strain of *E. coli* converted glucose to 1,3-PD with a high molar yield (91%) and had significantly increased titer (15.5 g/l) and productivity (1.55 g/l/h). Comparative whole-genome sequencing technology was used to identify genetic mutations in the new strain, revealing five mutated genes. These genes were *lpd*, *glpR*, *dhaK*, *nagD* and *GPP2*. Each of the mutations was further analyzed to determine the changes caused by the adaptive evolution and elucidate their influence in the whole metabolic engineering network. Herein, we demonstrate that the phenotype improvements were caused by these five mutations, which work together to increase the efficiency of the synthetic 1,3-PD production pathway and release the burden on central metabolism. In addition, the results demonstrate that the combination of metabolic network rational design and adaptive evolution is a valuable method in metabolic engineering for strain development and optimization.

Two molecules of pharmaceutical interest made in yeast: artemisinic acid and hydrocortisone

Bertin Marine ¹

1 : Sanofi

SANOFI Recherche

9, QUAI JULES GUESDE ? 94400 VITRY SUR SEINE -

In the past twenty years, molecular biology has evolved towards synthetic biology. On the one hand, synthetic chromosome and even synthetic organisms were constructed; on the other hand, challenging pathway engineering projects were achieved. In this presentation, two examples of molecules of pharmaceutical interest will be developed. Namely artemisinin, a traditional potent antimalarial compound and hydrocortisone, a well known immunosuppressor can be made hemi-synthetically or bio-synthetically, respectively in a recombinant *S.cerevisiae*, a well-known organism for industrial scale fermentation. The natural pathway corresponding to these compounds were elegantly transferred into a suitable host and their functions will be compared in their new environments. Artemisinic acid and hydrocortisone are pioneering works in Synthetic Biology. They open the possibility of making cheaper and greener pharmaceuticals.

L'éthique de la biologie de synthèse : «questions disputées

»

Magnin Thierry ¹

1 : Institut Catholique de Lyon
autres
23, place Carnot - 69002 LYON

Dans cette intervention, on passera en revue les différents niveaux du questionnement éthique relatif au développement de la biologie de synthèse :

1. Rapport bénéfices/risques : « biosécurité » et « biosureté » par exemple, avec notamment les problèmes de confinement et l'étude la robustesse des produits.
2. Ethique des risques : principes Responsabilité /Précaution.
3. Les buts poursuivis : exemple de la différence entre « l'homme réparé et l'homme augmenté » (l'homme 2.0) grâce aux nano-biotechnologies, avec toutes les questions sur le sens de l'homme que cela pose. La biologie synthétique entend fabriquer de nouveaux êtres vivants dans le cadre d'un processus contrôlé et ensuite maîtriser leurs fonctions. Comment juger de ce projet sous l'angle éthique ?
4. Le rapport au vivant et à la vie. La biologie de synthèse remet en question nos repères entre le naturel et l'artificiel, entre le vivant et l'inanimé et interroge nos responsabilités dans la génération de nouveaux êtres biologiques. La vie pourrait-elle alors ressembler à un « jeu » (le « jeu des possibles »), comme on joue au Lego ?
5. La différence entre la vie et les fonctions du vivant (du vivant au vécu) : les fonctionnalités du vivant doivent être distinguées (même si elles leur sont liées) de l'exercice de ces fonctions dans le vécu conscientisé en partie pour l'homme. Les récentes approches d'épigénétique et de plasticité cérébrale seront ici reprises.
6. Les impacts sociétaux
On explicitera alors une recherche nouvelle sur l'éthique de la vulnérabilité de tout vivant, à partir de la notion de robustesse en biologie de synthèse, avec un accent particulier pour l'application à l'humain.

L'intégrité et l'existence de l'espèce humaine comme normes politiques

Miquel Paul-Antoine ¹

1 : Equipe de Recherche sur les Rationalités Philosophiques et les Savoirs (ERRAPHIS)

Université Toulouse le Mirail - Toulouse II : EA3051

5, allées Antonio-Machado 31058 TOULOUSE Cedex 9

<http://www.univ-tlse2.fr/accueil/recherche/equipes/equipe-de-recherche-sur-les-rationalites-philosophiques-et-les-savoirs-erraphis--5476.kjsp>

Introduction

Il est question aujourd'hui de l'intégrité de l'espèce humaine, ou de son existence. Il en est question, non comme un débat spéculatif, mais de manière juridique. La loi de 1994 (16-4) relative au corps humain énonce que « nul ne peut porter atteinte à l'intégrité de l'espèce humaine ». En 2004 « les crimes contre l'espèce humaine » font leur apparition dans le Code pénal français[1]. Ils condamnent l'eugénisme et le clonage reproductif[2].

Le Crime contre l'espèce humaine, n'est pas un crime contre l'humanité, même si des travaux de M. Delmas Marty ont pu permettre de les mettre en relation, et sont sans doute au moins partiellement à l'origine de cette seconde appellation[3]. Dans la loi française, on entend par pratiques eugéniques, celles qui tendent « à l'organisation de la sélection des personnes », en précisant qu'il est question du caractère « systématique » de la sélection, et non d'une sélection fondée sur des choix propres à des couples « confrontés à l'annonce d'une maladie d'une particulière gravité ». On rejette le clonage reproductif considéré comme un crime, en tant qu'il porte atteinte au caractère sexué de la reproduction humaine, ainsi qu'à la diversité biologique de cette espèce. Encore une fois, on se réfère ici à une pratique « systématique », qu'il faut donc dissocier de l'existence de vrais et faux jumeaux humains dans la nature. Au contraire, le clonage thérapeutique n'est considéré que comme un simple délit, quoiqu'il reste cependant interdit en France.

Il n'y a pas de Crime contre l'existence de l'espèce humaine. Mais le principe de Précaution est entré dans la Constitution française (Charte de l'environnement, Article 5) depuis février 2005. Quoique les mots « homme » ou « humain » ne soient pas cités, il est bien question dans ce texte de l'espèce humaine, puisque le principe de précaution intervient quand « l'environnement » est mis en danger. Les critères qui permettent de définir le concept d'environnement sont écologiques. Ils ne sont pas simplement biologiques. Ensuite il est question de l'espèce humaine concernant un problème lié à la définition du concept de « risque ».

La science produit des effets, au sens où elle instrumentalise et « artificialise » l'espèce humaine. Elle nous empêche ainsi de continuer de la définir en termes de contraintes strictement naturelles et biologiques. Par les effets qu'elle produit, comme l'ont remarqué plusieurs auteurs récents, elle déplace les frontières entre le naturel et l'artificiel[4]. En déplaçant ces frontières, elle engage aussi une nouvelle forme de responsabilité : ce que sera l'humanité de demain dépend des décisions que nous allons prendre, et de la manière dont nous discuterons la valeur de ces décisions. Elle fait ainsi de l'existence et de l'intégrité de l'espèce humaine, des normes éthiques ou politiques et non plus de simples faits ou normes biologiques. Nous nous proposons d'analyser quelques aspects de ce retournement réflexif du biologique dans le politique, en nous demandant notamment quel type de rationalité pratique est susceptible de le prendre en charge ?

[1] Loi no 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique (JO no 182 du 7 août 2004).

[2] Art. 214-1. - Le fait de mettre en oeuvre une pratique eugénique tendant à l'organisation de la sélection des personnes est puni de trente ans de réclusion criminelle et de 7 500 000 EUR d'amende.

«Art. 214-2. - Le fait de procéder à une intervention ayant pour but de faire naître un enfant génétiquement identique à une autre personne vivante ou décédée est puni de trente ans de réclusion criminelle et de 7 500 000 EUR d'amende.

[3] M. Delmas-Marty, *Vers un droit commun de l'humanité*, Paris, Textuel, 1996.

[4] P. Descola, *Au-delà de nature et culture*, Paris, Gallimard, 2008, J.M. Schaeffer, *La fin de l'exception humaine*, Paris, Gallimard, 2008.

Le vivant entre nature et artifice: une organisation cellulaire suscitée?

Grégoire-Delory Vincent ¹

1 : Institut Catholique de Toulouse

Autre

31 rue de la Fonderie - BP 7012 31068 Toulouse Cedex 7

La biologie de synthèse permet désormais d'élaborer et de mettre en place de nouvelles fonctionnalités au sein du vivant qui, bien contraintes, permettent la production de molécules d'intérêt par exemple. Cette orientation du vivant interroge à frais nouveaux le statut éthique de tels organismes dont l'organisation cellulaire procède en partie d'une véritable ingénierie du vivant. Nous proposons le concept d'Organisation Cellulaire Suscitée (OCS) comme un outil participant à la description d'un éventuel continuum entre vivant et machine. Nous discuterons de la pertinence et des limites du concept très répandu de « machine vivante ».

Agilent and Integrative Biology

Skinner Nigel ^{1*}

1 : Agilent

industriel

Parc Technopolis ? ZA Courtaboeuf 3 avenue du Canada CS 90263 91978 LES ULIS CEDEX

* : Auteur correspondant

Présentation d'Agilent

Présentation du réseau ERA SynBio

Batoux Martine ¹

1 : Agence Nationale de la Recherche (ANR)
Autre
7 rue Watt 75013 Paris

Présentation de l'ERA-NET SynBio

Analyse systémique et ingénierie évolutive de la voie des pentoses-phosphate chez *S. cerevisiae*

Camarasa Carole¹, Cadière Axelle, Celton Magalie, Tilloy Valentin, Bigey Frédéric, Dequin Sylvie

1 : UMR 1083 Sciences pour l'oenologie INRA (UMR 1038-SPO)

Institut national de la recherche agronomique (INRA)

Bat 28 2 place Viala 34060 MONTPELLIER

www5.montpellier.inra.fr/spo/

Chez la levure, la voie des pentoses-phosphate (VPP) joue un rôle clé dans les biosynthèses des constituants cellulaires, en contribuant à la formation de précurseurs et à l'homéostasie NADPH. C'est donc une cible d'intérêt pour l'ingénierie métabolique, en vue de nombreuses applications en biotechnologie, notamment en oenologie. En combinant une démarche de modélisation (modèle à base de contraintes) à l'analyse de données transcriptomiques, nous avons montré que la VPP était une voie métabolique fortement flexible, soumise à la fois à un contrôle métabolique et à un contrôle génétique^{1,2}. Une stratégie non ciblée d'ingénierie évolutive, basée sur une adaptation long terme des cellules sur gluconate, hexose mal assimilé par les levures et incorporé au niveau de la VPP, a été utilisée pour augmenter le flux au travers cette voie³. Les souches évoluées montrent une meilleure croissance sur gluconate tout en conservant de bonnes performances fermentaires. Lors de la fermentation oenologique, la formation d'acétate par ces levures est diminuée, contrairement à la synthèse de composés volatils, qui, elle, est considérablement augmentée. Des essais à l'échelle pilote permettant de suivre en ligne la formation d'arômes fermentaires majeurs a montré que les souches évoluées produisaient de fortes quantités d'alcools supérieurs et d'esters d'acétate, déterminants clés des notes fruitées des boissons fermentées⁴. Afin d'identifier les mécanismes sous-jacents à ces phénotypes, nous avons comparé le profil d'expression génique et la distribution des flux intracellulaires des levures sauvages et évoluées. L'analyse ¹³C-flux révèle un flux au travers de la VPP plus élevé chez la souche évoluée, en lien avec une augmentation de l'expression de deux gènes de cette voie, GND1 et TLK1. L'expression de gènes du métabolisme de l'azote et de la voie d'Ehrlich est également induite chez ce mutant. Enfin, le séquençage du génome de 6 levures évoluées nous a permis d'identifier une mutation dans le gène BCY1, qui est impliqué dans le contrôle la voie de signalisation centrale PKA, expliquant la plupart des phénotypes observés chez ces souches.

¹Celton M. et al. (2012). *Metabol. Eng.* 14: 366-379.

²Celton M. et al. *BMC Genomics* 13:317.

³Cadière A. et al. (2011). *Metabol. Eng.* 13: 263-271.

⁴Cadière A. et al. (2012). *Food Microbiol.* 32:332-337.

Ingénierie de composants génétiques standardisés pour le contrôle précis et modulable de l'expression des gènes chez *Bacillus subtilis*

Guiziou Sarah ¹, Le Monnier Elodie ¹, Declerck Nathalie ¹, Bonnet Jerome ^{2*}

1 : Centre de Biochimie Structurale (CBS)

Inserm Université Montpellier II - Sciences et techniques CNRS : UMR5048 Université Montpellier I
29 rue de Navacelles 34090 MONTPELLIER Cedex - France
<http://www.cbs.cnrs.fr/spip.php?rubrique80>

2 : Centre de Biochimie Structurale (CBS)

Inserm : U1054 Université Montpellier II - Sciences et techniques CNRS : UMR5048 Université Montpellier I
29 rue de Navacelles 34090 MONTPELLIER Cedex - France
<http://www.cbs.cnrs.fr/spip.php?rubrique80>

* : Auteur correspondant

Bacillus subtilis est la bactérie gram positif modèle et un châssis industriel important pour la production d'enzymes et d'antibiotiques. En biologie de synthèse, *Bacillus subtilis* est encore peu utilisé et peu d'outils d'ingénierie pour la régulation fine des gènes existent. Ces outils sont essentiels à la conception de circuits de régulations complexes. Nous développons une boîte à outil de régulateurs géniques précis, fiables et prédictibles chez *B. subtilis* ainsi que des méthodes de constructions et de mesure précise de l'expression des gènes.

Dans un projet pilote, nous avons conçu et caractérisé une librairie de ribosome binding sites de forces variables. Une librairie de promoteurs est également en cours de conception.

Pour faciliter l'assemblage des composants génétiques, nous avons conçu un système de vecteur d'intégration modulaire qui permet d'assembler et d'inter-changer de façon modulaire et standardisée les biobriques en clonage par restriction enzymatique ou par Gibson assembly.

D'autre part, nous déterminons les niveaux d'expression géniques avec une précision inégalée en utilisant la méthode de microscopie 2-photon number and brightness (2pN&B) permettant de déterminer le nombre de molécules fluorescentes (GFP) par cellule. Pour assurer une meilleure reproductibilité entre expériences et entre différents laboratoires, nous utiliserons un promoteur de référence.

Ce travail facilitera la conception de circuits géniques complexes aux propriétés prévisibles. Les outils et concepts développés durant ce projet seront utiles à la communauté scientifique travaillant sur *B. subtilis* que se soit pour de la recherche fondamentale ou à des fins industrielles.

System-approach to unravel the true function of TPS system in yeast energetic homeostasis

François Jean Marie¹, Petitjean Marjorie, Vax Amelie, Walther Thomas, Parrou Jean Luc

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

In spite of remarkable molecular and biochemical researches on glucose metabolism, all attempts to control and enhance the glycolytic flux in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by rational modifications of the pathway has failed. This failure can be interpreted by our incomplete knowledge on the regulation of this central metabolic pathway in this yeast. Bearing this in mind, TPS1 encoding the trehalose-6-P synthase is of particular relevance in glycolytic flux. Indeed, loss of TPS1 function causes growth defect on rapid fermentable sugars, such as glucose and fructose, apparently due to depletion of ATP and hyper accumulation of sugar phosphates. Two models have been proposed to account for this phenotype, namely (i) a restriction of the glucose influx due to inhibition of hexokinase by trehalose 6-P (T6P), the product of the reaction catalyzed by Tps1 and (ii) the Pi-regeneration associated with trehalose cycling. However, several phenotypes and metabolic defects of tps1 mutant cannot be explained by neither of these two models. We reconsider this fundamental regulatory question by uncoupling the three elements in the TPS system, through creation of a catalytic inactive variant of Tps1 (tps1*). We found that hyper-accumulation of sugars phosphate and ATP depletion upon glucose addition to respiratory growing tps1⁻ mutant were abolished upon expression of the Tps1* variant. In spite of this metabolically rescue, tps1⁻ tps1* strain did not fully recover fermentation capacity and growth on glucose was severely delayed. Moreover, a tps1⁻ strain expressing OtsA protein could produce high levels of T6P, but quickly presented a strong lethality and stop growing on this sugar. Finally, the tps1⁻ tps1* strain expressing OtsA protein was able to recover normal fermentation capacity and to rapidly grow on fermentable sugars. The necessity for a T6P threshold in full fermentation capacity was evidence by modulating its intracellular level. Altogether, these data provide evidence that the TPS system in yeast is composed of two distinct 'modules': module 1- the protein Tps1 is indispensable for growth on fermentable sugars and has additional function on its own, whereas module 2 -T6P- is needed in the rapid switch between respiration and fermentation, and as such may contribute to the Crabtree effect.

meta3C unveils the diversity of chromosome organization in microorganisms

Marbouty Martial, Cournac Axel, Marie-Nelly Herve, Flot Jean-Francois, Mozziconacci Julien, Koszul Romain ¹

1 : Regulation spatiale des genomes, Departement Genomes et Genetique
Centre National de la Recherche Scientifique - CNRSInstitut Pasteur de Paris
28 rue du Dr. Roux, 75015 Paris

Analysis of metabolic and genetic networks of complex mixes of species is complicated by the difficulty to recover good assemblies of the genomes present in the mix. Using controlled mixes of bacterial and yeast species, we show that the frequent physical contacts experienced by chromosomes that share similar cellular compartment in a metagenome can be measured by performing high-throughput chromosome conformation capture experiments (meta3C). Not only can the reads of a meta3C library be used for the de novo assembly and scaffolding of unknown genomes, but a meta3C experiment can also be used to characterize the average 3D chromosome organization of mixed species whose genomes are already known, unveiling their global organization. By applying the meta3C approach onto a complex environmental sample, we confirm that it provides an elegant and efficient way to metagenomic analysis and pave the way to full genomic assembly of metagenomes. Overall, this first meta3C study increases highlights the remarkable diversity of chromosome organization in microorganisms, while providing an elegant and integrated approach to metagenomic analysis.

From TPP-riboswitch regulation mechanism to TPP biosynthetic network regulation

Burnouf Dominique ^{1*}, Guedich Sondes ¹, Walter Philippe ¹, Bichara Marc ², Dumas Philippe ¹

1 : Institut de biologie moléculaire et cellulaire (IBMC)

CNRS : FRC1589

I.B.M.C. 15 Rue René Descartes 67084 STRASBOURG CEDEX

<http://ibmc.u-strasbg.fr/>

2 : ESBS (Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg)

université de Strasbourg

ESBS Parc d'innovation 300, boulevard Sébastien Brant BP 10413 67412 ILLKIRCH CEDEX

<http://irebs.u-strasbg.fr/spip.php?rubrique61>

* : Auteur correspondant

We have studied the functioning of two thiamine pyrophosphate (TPP) riboswitches, thiC and thiM, in *E. coli*. These homologous riboswitches, located in the 5'-UTR of mRNAs, can sense the intra-cellular level of TPP and regulate either premature transcription arrest, as with thiC, or translation inhibition, as with thiM. We showed that these riboswitches (i) function according to a two-step 'induced fit' mechanism and (ii) regulate the TPP concentration kinetically since their affinity for the TPP ligand is too high for an efficient classical regulation. We set up a quantitative model linking all measured kinetic parameters of the induced-fit mechanism to the TPP-concentration-dependence of the probability of these riboswitches to be in the ON or OFF state [1, 2].

We are now extending this mechanistic work to the understanding of the complete TPP-biosynthetic regulation network in *E. coli*, which involves eleven genes, organized in three operons, thiCEFGSH, thiMD, and thiBPQ, each controlled by the riboswitches thiC, thiM and thiB, respectively [3]. We have initiated an experimental work, aimed at obtaining quantitative measurements of all network compounds (substrates, products mRNA, proteins) and understanding, among other things, the importance (i) of the topology of the network, (ii) of the nature of a riboswitch (transcription or translation regulator?). We have also developed a software for simulating the network functioning (unpublished). As such, this software shows very well how any sudden perturbation of various input-product concentrations are rapidly smoothed out by the network that rapidly stabilizes the concentration of the TPP output product. Both quantitative biological analyses and computer simulations will be developed in parallel and combined for designing a realistic model of the network regulation.

[1] Burnouf D. et al. (2012) kinITC: a new method for obtaining joint thermodynamic and kinetic data by isothermal titration calorimetry. *JACS* 134, 559

[2] Guedich S. et al. 'Regulation mechanisms and temperature dependence of TPP riboswitches' Submitted.

[3] Rodionov, D.A. (2002) Comparative Genomics of Thiamin Biosynthesis in Prokaryotes. NEW GENES AND REGULATORY MECHANISMS. *JBC*, 277, 48949.

La 3-mercaptopyruvate sulfurtransférase : une enzyme mitochondriale impliquée dans la production de sulfure d'hydrogène.

Boschi-Muller Sandrine ¹, Talfournier François ^{1*}

¹ : Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie - UMR CNRS 7561 - Université de Nancy (IMoPA)

CNRS : UMR7365 Université de Lorraine

9 Avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre les Nancy

* : Auteur correspondant

La 3-Mercaptopyruvate sulfurtransférase (3-MST) est une enzyme ubiquitaire qui participe au catabolisme de la cystéine et à la production de sulfure d'hydrogène (H₂S), en particulier dans la mitochondrie. La 3-MST appartient à la famille des enzymes à domaine rhodanèse et elle catalyse le transfert d'un atome de soufre du 3-mercaptopyruvate (3-MP) vers un accepteur comme par exemple un thiol, dont la décomposition conduirait à la formation d'H₂S. Son mécanisme comporte a minima 2 étapes : une première étape de transfert de soufre du 3-MP vers la cystéine catalytique conduisant à la formation concomitante d'un intermédiaire persulfure et de pyruvate, suivie d'une étape de transfert de soufre de cet intermédiaire vers un accepteur. A ce jour, peu d'informations existent concernant les bases moléculaires responsables de la catalyse et la spécificité structurale de cette enzyme. C'est pourquoi une étude de relations structure-fonction par ingénierie a été entreprise sur la 3-MST d'*Escherichia coli* utilisée comme modèle. L'examen de la structure tridimensionnelle de la 3-MST humaine en complexe avec le pyruvate et des séquences des 3-MST caractérisées montrait la présence de différents résidus au niveau du site actif qui pourraient jouer un rôle dans la catalyse et/ou la spécificité de substrat. Ces résidus ont été substitués individuellement par mutagenèse dirigée et les propriétés cinétiques des mutants obtenus ont été déterminées en présence de 3-MP comme donneur de soufre et de thiorédoxine comme accepteur. De plus, plusieurs approches ont été développées afin de pouvoir déterminer les constantes de vitesse associées aux deux étapes de la réaction.

Etude structure-fonction de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* : Développement d'un outil de sélection in vivo d'enzymes modifiées fonctionnelles.

Gauquelin Charles ¹, Soucaille Philippe ², Meynial-Salles Isabelle ²

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA] : EA3
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

2 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

Les [Fe-Fe]-hydrogénases sont des métallo-enzymes capables de catalyser à la fois la synthèse et le clivage d'une molécule d'hydrogène selon la réaction :

$H_2 \rightarrow 2H^+ + 2e^-$. Ces enzymes, présentes chez de nombreux micro-organismes, pourraient être utilisées comme catalyseur idéal pour la production d'hydrogène dans le cadre de stratégies d'utilisations d'énergies renouvelables. Parmi ces hydrogénases, HydA, l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* a été identifiée comme une des enzymes les plus efficaces pour la production d'hydrogène, mais son utilisation reste limitée en raison d'une forte sensibilité à l'oxygène.

Afin d'améliorer la compréhension du mécanisme catalytique de l'hydrogénase à fer de *C. acetobutylicum* et du phénomène d'inhibition par l'oxygène et l'hydrogène, l'équipe d'Ingénierie et d'Evolution des Voies Métaboliques chez Les Procaryotes a développé un système de surexpression de ces hydrogénases chez *C. acetobutylicum*, permettant leur production puis leur purification en une étape. Les enzymes purifiées sont ensuite caractérisées par des techniques combinées de biochimie et d'électrochimie (Girbal et al. 2005, Lautier et al. 2011, Baffert et al. 2012, Fourmond et al. 2014). Bien qu'efficace pour la production d'enzymes purifiées, ce système ne permet cependant pas la sélection directe de variants d'hydrogénase biologiquement actifs.

C'est pourquoi, ces travaux sont actuellement poursuivis à travers le développement de nouvelles souches ingénierées de *C. acetobutylicum* permettant le criblage et la sélection in vivo de variants de l'hydrogénase Fe-Fe catalysant la réduction des protons. Cette stratégie, utilise des souches de *C. acetobutylicum* génétiquement modifiées pour lesquelles la survie de la souche est dépendante de la surexpression d'une hydrogénase fonctionnelle, permettant ainsi de sélectionner directement des enzymes modifiées catalysant la production d'hydrogène.

Plusieurs hydrogénases modifiées catalysant la réduction in vivo des protons ont déjà été sélectionnées à l'aide des nouvelles souches ingénierées. La caractérisation physiologique des souches ingénierées d'une part, et la caractérisation des enzymes purifiées d'autre part, sont actuellement en cours.

CHARACTERIZATION OF β -GALACTOSIDASE AND SUCROSE KINASE ACTIVITIES FROM A HUMAN MICROBIOTA BIFUNCTIONAL ENZYME (AgaSK).

Giardina Thierry ^{1*}

1 : Institut des Sciences Moléculaires de Marseille (ISM2)

Aix-Marseille Université - AMU

Aix Marseille Université, Centrale Marseille, CNRS, iSm2 UMR 7313, 13397, Marseille

* : Auteur correspondant

β -galactosides are non digestible carbohydrates present in many leguminous plants that are a dominant carbon source in many plant-derived foods and the raffinose family oligosaccharides (RFOs) and sucrose are the most abundant. However, no $\beta(1,6)$ galactosidase activity exists in the human intestine mucosa and β -galactosides are exclusively fermented by microbial $\beta(1,6)$ galactosidases (EC3.2.1.22). Recently we characterized a bifunctional enzyme, the $\beta(1,6)$ galactosidase/sucrose kinase (AgaSK) whose gene is highly transcribed in vivo by *Ruminococcus gnavus* E1, a major member of human dominant intestinal microbiota¹. Sequence analysis showed that AgaSK is composed of two domains: one closely related to β -galactosidases from glycoside hydrolase family GH36 and the other containing a nucleotide binding motif (Walker A motif). Its biochemical characterization showed that AgaSK is able to hydrolyze efficiently soluble β -galactosides and to bind nucleotide to phosphorylate specifically on the C6 position of glucose sucrose. In addition, AgaSK isolated domains were produced and biochemical studies shown they are active separately. However, no differences were observed between the whole protein and isolated domains. Kinetic parameters were determined using, melibiose, raffinose and stachyose as substrate with AgaSK and Aga domain. HPAEC-PAD analysis demonstrated that the length of RFOs impacted on catalytic efficiency. The crystal structures of the galactosidase domain in the apo form and in complex with the product shed light onto the reaction and substrate recognition mechanisms and highlight an oligomeric state necessary for efficient substrate binding and suggesting a cross-talk between the galactose and kinase domains.

Modélisation moléculaire et ingénierie d'un CBM d'une laminarinase pour la reconnaissance de différents sucres.

Dion Michel ¹, Offmann Bernard ^{2*}, Hendrickx Johann ^{3*}, Hoffmann Lionel ³, Tellier Charles ³

- 1 : université de nantes (UFIP)
CNRS : UMR6286 Université de Nantes
2 rue de la Houssinière 44322 nantes cedex 03
<http://www.ufip.univ-nantes.fr/>
- 2 : Université de Nantes (UFIP)
CNRS : UMR6286
Faculté des sciences, 2 rue de la Houssinière 44322 Nantes cedex 03
<http://www.ufip.univ-nantes.fr/>
- 3 : université de nantes (ufip)
CNRS : UMR6286
2 rue de la houssinière 44322 Nantes cedex 03
<http://www.ufip.univ-nantes.fr/>
- * : Auteur correspondant

Modélisation moléculaire et ingénierie d'un CBM d'une laminarinase pour la reconnaissance de différents sucres.

Offmann B., Hendrickx J., Hoffmann L., Tzigova G., Bougouin A., Tellier C., Dion M.
UFIP (Unité sur la Fonctionnalité et l'Ingénierie des Protéines) ; UMR CNRS 6286
Faculté des Sciences et Techniques, Université de Nantes ; 44322 Nantes Cedex 03
Nous développons de nouvelles lectines par ingénierie semi-rationnelle à partir d'un CBM (Carbohydre Binding Module) d'une laminaribiase de *Thermotoga maritima*. Celui-ci possède des caractéristiques intéressantes comme sa thermostabilité et sa forte affinité à 20°C pour le laminaropentaose ($K_d=0,5\mu\text{M}$) (Boraston et al, 2001). Cette affinité est tout à fait exceptionnelle pour un CBM, qui à la température d'activité de l'enzyme (80°C), est 1000 fois plus faible. Sa structure étant déterminée (Boraston et al, 2002), nous avons entrepris la modification de sa spécificité par une approche semi-rationnelle. La mutagénèse saturante de certains des 10 acides aminés du site actif a été réalisée mais bien que des mutants présentent des caractéristiques intéressantes, le criblage (par Blitz, spectrofluorométrie et ITC) s'avère lourd et n'explore qu'une faible partie des combinaisons possibles (1013).

En conséquence, nous avons mis au point une méthode de prédiction de l'affinité par modélisation moléculaire. Pour chaque mutant ponctuel, un ensemble de structures censées représenter la diversité de leurs conformations en solution est généré. Ces structures sont criblées par docking moléculaire pour leur capacité à se lier correctement aux ligands étudiés. Un pseudo-potentiel statistique basé sur le nombre de conformations donnant des complexes répondant à ce critère se révèle être un très bon estimateur de l'affinité du CBM vis-à-vis du laminarohexaose que nous avons utilisé pour représenter le ligand naturel. Une excellente estimation du K_d du CBM natif vis à vis de la laminarotriose ($K_d=5\mu\text{M}$) indique que la méthode serait généralisable à d'autres ligands. Nous l'avons appliqué pour identifier les mutants ponctuels présentant un gain d'affinité pour l'antigène LewisX ($\text{Gal}\beta 1,4[\text{Fuc}\beta 1,3]\text{GlcNAc}$), qui a la propriété de ne présenter qu'une seule conformation. Les mutants correspondants seront construits afin de valider la méthode.

Boraston et al.(2001) *Biochemistry*, 40, 14679-85.
Boraston et al.(2002) *J. Mol.Biol.*, 319, 1143-56.

La biologie des systèmes de la fermentation cellulosique

Tolonen Andrew ¹

1 : Génomique métabolique (UMR 8030)

CEACNRS : UMR8030 Université d'Evry-Val d'Essonne

GENOSCOPE, 2 rue Gaston Crémieux 91057 Evry Cedex

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/UMR-8030-de-Genomique-metabolique.html>

La biomasse cellulosique est la source la plus abondante d'énergie biologique du monde. Elle a un grand potentiel pour produire les biocarburants et bioproduits renouvelables, mais elle se compose d'une matrice de polysaccharides et lignine qui est très difficile à dégrader. Nos recherches intègrent diverses méthodes (l'ingénierie génétique, biochimie, protéomique, modélisation) pour développer une compréhension systématique de la façon dont les microbes fermentent la biomasse. On se concentre sur *Clostridium phytofermentans*, une bactérie du sol qui sécrète des dizaines d'enzymes de dépolymérisation de la biomasse en hexoses et pentoses, qu'elle fermentent alors en l'éthanol et hydrogène. Cette présentation décrira nos récents progrès sur les mécanismes moléculaires par lesquels ce microbe dégrade et fermentent la biomasse et comment ces données inspirent les nouvelles stratégies pour la transformation de la biomasse en biocarburants et bioproduits.

MetaToul Platform - Center of expertise in metabolomics & fluxomics

Peyriga Lindsay¹, Bellvert Floriant², Debrauwer Laurent³, Bertrand-Michel Justine⁴,
Danoun Saïda⁵, Portais Jean-Charles⁶

1 : PEYRIGA Lindsay

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse

135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

2 : BELLVERT Floriant

CNRS : UMR5504Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse

135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

3 : DEBRAUWER Laurent

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR1331Institut National Polytechnique de Toulouse - INPTUniversité Paul Sabatier-Toulouse III - UPS

ToxAlim INRA Saint Martin du Touch

4 : BERTRAND-MICHEL Justine

Inserm : U1048

I2MC INSERM Ranguel

5 : DANOUN Saïda

CNRS : UMR5546Université Paul Sabatier-Toulouse III - UPS

LRSV Centre INRA Auzeville

6 : PORTAIS Jean-Charles

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - ToulouseUniversité Paul Sabatier-Toulouse III - UPS

135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse cedex 4

MetaToul is the Metabolomics and Fluxomics Platform of the Genopole de Toulouse (www.metatoul.fr). It brings together expertise (researchers, engineers, technicians) and means (heavy equipment: Nuclear Magnetic Resonance (NMR), mass spectrometry (MS)) in the field of global analysis of metabolism. MetaToul provides to the scientific community the concepts, tools and methods related to the analysis of metabolism at the level of a biological system (cell, tissue, and organism)

13C-Fluxomic and Isotopic Profiling Powerful tools for metabolism investigation

Peyriga Lindsay ¹, Bellvert Floriant ^{2*}, Cahoreau Edern ³, Sokol Serguei ⁴, Gales Lara ⁵, Kulyk-Barbier Hanna ⁶, Portais Jean-Charles ⁷

1 : PEYRIGA Lindsay

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

2 : BELLVERT Floriant

CNRS : UMR5504Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

3 : CAHOREAU Edern

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

4 : SOKOL Serguei

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse cedex 4

5 : GALES Lara

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

6 : KULYK-BARBIER Hanna

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse Cedex 4

7 : PORTAIS Jean-Charles

Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - ToulouseUniversité Paul Sabatier-Toulouse III - UPS
135 avenue de Ranguel 31077 Toulouse cedex 4

* : Auteur correspondant

Metabolic fluxes ? i.e. the actual in vivo rates of biochemical reactions ? represent the most accurate parameter for characterizing the actual operation of metabolic networks under specific physiological conditions. Intracellular metabolic fluxes are not measurable directly but can be accessed experimentally using 13C-labeling strategies (13C-fluxomics). The labeling patterns of metabolites (or end-products), measured by either MS or NMR, allows the calculation of intracellular fluxes from thanks to mathematical models describing the transition of single atoms in biochemical reactions as well as mass balances (Portais 1993, Szyperski, 1995; Wittmann, 2007).

Attenuation of the post-transcriptional regulator CsrA activity results in a strong G6P stress impairing the growth of Escherichia coli on glucose.

Morin Manon ¹, Létisse Fabien ², Portais Jean-Charles ³, Ropers Delphine ⁴, Cocaign-Bousquet Muriel ⁵, Enjalbert Brice ⁶

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut national de la recherche agronomique (INRA)INRIA
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

2 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA]Université Paul Sabatier-Toulouse III - UPS
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

3 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Université Paul Sabatier-Toulouse III - UPS

135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

4 : INRIA-Alpes

INRIA

655 avenue de l'Europe, Montbonnot 38334 Saint-Ismier Cedex, France

5 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

INRA

135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

6 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA]Institut national de la recherche agronomique (INRA)

135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

Background: In biotechnologies, the understanding of Escherichia coli metabolic properties is essential to control its proliferation and anabolic capacities. A role in the regulation of E. coli central carbon metabolism has been suggested for the CSR system (Carbon Storage Regulator). This system is an essential, pleiotropic and post-transcriptional regulator believed to enhance the glycolysis flux while inhibiting the gluconeogenesis. However, the mechanisms behind these functions remain unclear.

Method: Here, a multi-level approach has been performed to investigate the metabolic organization on glucose of a wild type strain and its isogenic csrA51 mutant (a strain with an attenuated but viable CSR system). Gene expression, enzymatic activities, metabolite concentrations and flux distributions were quantified. The contribution of the molecular entities to the flux regulation has been evaluated using simple kinetic models and hierarchical regulation analysis.

Results: These investigations pinpointed a major default in both the expression and activity of the Phosphofructokinase A (PfkA), a notable limiting step in the glycolysis. Using substrates bypassing PfkA allows confirming the critical role of PfkA. Furthermore, we found that the csrA51 low level of PfkA creates an accumulation of Fructose-6-Phosphate and Glucose-6-Phosphate during the growth on glucose. This results in the overexpression of sgrS which in turn inhibits the entrance of glucose into the cell and thereby, creates the low growth rate observed in a csrA51 mutant.

Conclusion: This work provides important new insights in the role of the CSR system in the carbon metabolism of Escherichia coli. The multi-level and integrative approach proved to be especially performing to investigate the cause of the CSR system essentiality. Since CSR controls the glycolytic flux, these results open new possibilities to increase targeted compound production in metabolic engineering applications.

Translation regulations play a major role in gene expression in bacteria

Picard Flora ¹, Racle Julien ², Hatzimanikatis Vassily ², Girbal Laurence ¹, Cocaign-Bousquet Muriel ¹

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

2 : Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL)
Swiss Federal Institute of Technology EPFL-FSTI IEL-LTS2, Station 11 Lausanne 1015 - Switzerland
<http://www.epfl.ch/>

Background: Bacterial adaptation to stress is governed by large changes in gene expression involving a multi-layer process with heterogeneous constituents and multi-scale regulations. Translation allowing the transfer of gene coding information from RNA to protein through ribosome action is one of the less understood levels. Examples of specific translation regulations (involving ncRNA, RBP etc.) are today more and more frequently reported in bacteria but these translational regulations are generally not taken into consideration in global approaches of systems biology.

Method: Translation was experimentally studied at the genome-scale by translato-me experiments in the model bacterium *Lactococcus lactis* in exponential growth phase (1) and in stress conditions (2). The ribosome density data was estimated for more than one thousand gene species of the bacterium. This large data set was used to model and analyse the protein synthesis rate and controls for each individual gene (3).

Results: This work allowed observing that less stable mRNAs (short half-life) tend to be more engaged in translation with higher polysome sizes. In addition, for genes with high ribosome occupancy, we have identified a conserved nucleotide pattern (sometimes forming inverted repeat sequences) upstream of the start codon. Contrary to conventional believe of translation initiation limitation, the study showed a significant number of genes with elongation limitation. Clear links were observed in *L. lactis* cells between gene function and translation rate and control. These links were in agreement with cellular requirements when cells faced stressing environments.

Conclusion: These results show that coupling of metabolic states and protein synthesis is more important than previously thought and suggest that bacterial physiology could depend strongly on translation regulations. Furthermore, this work opens new strategies to increase gene expression in the field of synthetic biology.

References

- 1) Picard F, Milhem H, Loubière P, Laurent B, Cocaign-Bousquet M#, Girbal L#. 2012. BMC Genomics. 13(1):528.
- 2) Picard F, Loubière P, Girbal L#, Cocaign-Bousquet M#. 2013. BMC Genomics. Aug 28;14:588.
- 3) Racle J, Picard F, Girbal L, Cocaign-Bousquet M, Hatzimanikatis V. 2013. PLoS Comput. Biol. 9(10):e1003240.

Genome-wide regulation of gene expression is controlled by dual role of transcription and transcript stability in bacteria

Esquerré Thomas ¹, Laguerre Sandrine ¹, Turlan Catherine ², Carpousis Agamemnon ²,
Cocaign-Bousquet Muriel ¹, Girbal Laurence ¹

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
Institut National des Sciences Appliquées (INSA) Institut National des Sciences Appliquées [INSA]
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04
2 : Laboratoire de microbiologie et génétique moléculaires (LMGM)
CNRS : UMR5100 Université Paul Sabatier (UPS) - Toulouse III
118 route de Narbonne 31062 Toulouse cedex 9
<http://www-lmgm.biotoul.fr/>

Objectives: Microorganisms extensively reorganize gene expression to adjust growth rate to changes in growth conditions. In particular, growth rate adjustments involve a multi-level cellular reorganization associated with substantial modifications of gene expression and mRNA abundance. In this work we aimed at assessing at the genomic scale the contribution of both transcription and transcript stability to regulating mRNA concentration in bacteria.

Method: Genome-wide transcriptomic-based methods were used to determine mRNA concentrations and half-lives in the bacterium *Escherichia coli* at four different growth rates (1). We used a formal mathematical method (2) to integrate the large datasets and to model the contributions of transcriptional and degradational control to determining mRNA concentration changes between two growth rates.

Results: Global and individual mRNA stabilities and concentrations differed in *E. coli* cells growing at different growth rates. We identified five classes of mRNA concentration regulation ranging from mainly transcriptional to mainly degradational. Transcription was the most predominant regulatory process in particular for functions related to growth. But at high growth rates, changes in mRNA stability controlled concentration of a high number of transcripts involved in essential metabolic pathway such as the central carbon catabolism. Moreover, using linear covariance models, we identified and ranked intrinsic and extrinsic transcript parameters involved in messenger lifetime determination at the different growth rates.

Conclusion: This analysis shows for the first time in bacteria that the genome-wide control of mRNA concentration is a multi-scale system involving important transcription regulation but also fine-tuning control through regulation of transcript stability. Modulation of transcript stability could constitute a novel strategy for gene expression regulation in *E. coli* in the field of synthetic biology.

References

1. Esquerré T, Laguerre S, Turland C, Carpousis AJ, Girbal L and Cocaign-Bousquet M. 2014. *Nucl. Acids Res.* 42(4):2460-2472.
2. Dressaire C, Picard F, Redon E, Loubière P, Queinnec I, Girbal L and M Cocaign-Bousquet, 2013. *PloS One.* 8(3):e59059.

Systematic substitution of thymine by 5-chlorouracil in the DNA of *Escherichia coli*

Doring Volker¹, Patrouix Julien¹, Bouzon Madeleine¹, Mutzel Rupert², Marlière Philippe³, Weissenbach Jean⁴

1 : Génomique métabolique (UMR 8030)

CEACNRS : UMR8030 Université d'Evry-Val d'Essonne

GENOSCOPE, 2 rue Gaston Crémieux 91057 Evry Cedex

<http://www.genoscope.cns.fr/spip/UMR-8030-de-Génomique-metabolique.html>

2 : Freie Universität Berlin

14195 Berlin

3 : Marlière (Heurisko USA Inc.)

Delaware

4 : CEA/IG/Genoscope-UMR 8030 Génomique Métabolique

CEA

Genoscope-Centre National de Séquençage 2, rue Gaston Crémieux CP5706 91057 EVRY Cedex

Genome-scale modification of base usage in nucleic acids has apparently not evolved in any known living cells, possibly because of a chemical barrier that natural biodiversity cannot overcome. To achieve a genome wide change in DNA composition we executed an experimental plan consisting of the construction of *E. coli* selection strains blocked in the biosynthesis of the canonical DNA base thymine and long-term cultivation of these strains in the presence of growing concentrations of the non-natural thymine homologue 5-chlorouracil. Strain evolution during the cultivation process, conducted in the GM3 automated culture devices, led to cells showing thymine to 5-chlorouracil substitution levels of virtually 100 % in their genomes. This change in DNA base composition was perfectly compatible with cell proliferation.

Genome sequencing of different 5-chlorouracil dependent lineages and comparison of their mutation patterns reveals some common characteristics:

A high number of point mutations per genome (between 120 and more than 1500), 35 % of them being silent. This suggests a direct mutagenic effect of the thymine homologue 5-chlorouracil, most probably through mispairing with guanine. In addition, various mutations have been found in genes involved in DNA repair mechanisms. At least some of them are likely to entail inactivation of the respective protein and probably have contributed to the high mutation rate. Very few genes are mutated in all the different lineages obtained. However mutations were highly frequent in some gene classes coding for functionally related proteins. These involved enzymes active in the correction of base mispairings, enzymes of the nucleic acid metabolism (polymerases, helicases) and various transcriptional regulators.

Experiments are currently conducted in order to explore the mechanism of cellular adaptation to an artificial base in DNA. Further long term cultivation processes have allowed the selection of 5-chlorouracil dependent mutants showing impaired growth on the natural base thymine, pointing to the possibility that descendants could be evolved for which thymine would be a xenobiotic compound.

Artificial riboswitches based on RNA-RNA kissing complexes as potential regulator of gene expression.

Toulme Jean-Jacques¹, Dausse Eric, Ravelet Corinne, Durand Guillaume, Peyrin Eric

1 : ARN : régulations naturelle et artificielle (ARNA)

Inserm Université Victor Segalen - Bordeaux III Institut Européen de Chimie et de Biologie

Université Victor Segalen 146, rue Leo Saignat bâtiment 3a 33076 BORDEAUX CEDEX

Riboswitches are RNA modules comprised of a sensor that includes the binding site for a small ligand. They respond to association with this ligand by undergoing a conformational change. In biological systems the conformational change of the sensor impacts the function of an expression platform, for instance the open reading frame of a mRNA. The sensor is the functional equivalent of an aptamer, i.e. an oligonucleotide that exhibits a high efficiency and a high specificity of binding to the target against which they were raised.

Taking advantage of a previously published work [1] we designed new sensors based on kissing complexes resulting from the interaction between two RNA hairpins displaying complementary loops. We engineered hairpin aptamers in such a way that they switch from unfolded to folded conformation upon binding to their cognate ligand, hence the generic name "aptaswitch" (Figure 1). The folded state is recognized by a short RNA hairpin termed "aptakiss" that engages loop-loop (kissing) interactions. We show that the aptaswitch-aptakiss sensing complex allows the specific response to adenosine or GTP [2] thus allowing their potential use as conditional regulators of gene expression.

Figure 1. The aptakiss (in yellow) interacts with the folded aptaswitch (top) through loop-loop helix formation (red), but not with the unfolded structure (bottom). Aptaswitch folding is induced by binding to its cognate ligand (orange).

References

1. Ducongé, F., Di Primo, C. and Toulmé, J.J. (2000) Is a closing "GA pair" a rule for stable loop-loop RNA complexes? *J. Biol. Chem.*, 275, 21287-21294.

2. Durand, G., Lisi, S., Ravelet C., Dausse, E., Peyrin, E.* and Toulmé, J.-J.* (2014) Kissing complex-based riboswitches for the detection of small ligands. *Angewandte Chemie Int Ed* (in press).

Diversité des flux métabolique chez la levure en fermentation

Nidelet Thibault*, Brial Pascale, Sanchez Isabelle, Legras Jean-Luc, Camarasa Carole¹,
Dequin Sylvie

1 : UMR 1083 Sciences pour l'oenologie INRA (UMR 1038-SPO)

Institut national de la recherche agronomique (INRA)

Bat 28 2 place Viala 34060 MONTPELLIER

www5.montpellier.inra.fr/spo/

* : Auteur correspondant

Saccharomyces cerevisiae est un des organismes les plus importants pour la production d'aliments fermenté (bière, pain, vin etc..). Afin d'améliorer à la fois les pratique et les souches il est important de comprendre le métabolisme fermentaire en explicitant quelles en sont les contraintes et la robustesse. Pour cela nous avons développé un modèle à base de contrainte dédié à la fermentation chez la levure pour quantifier la contribution des différentes voies métaboliques au phénotype fermentaire. Nous avons utilisé ce modèle pour étudier la flexibilité du réseau métabolique et en identifier les noeuds le plus flexible ou robuste ainsi que pour mettre en évidence d'éventuelles trade-offs. Pour cela nous avons étudié la distribution des fluxes chez une cinquantaine de souches provenant de 8 origines phylétiques. Ces souches ont poussé dans des conditions de vinification en présence de 240g/L de sucre et de 200 mg/L de source d'azote assimilable sous forme d'un mélange d'acide aminés et d'ammonium. La consommation et la production de métabolites (éthanol, CO₂, glycérol, acétate, succinate et pyruvate) a été mesuré en fin de phase de croissance exponentielle et utilisé pour contraindre notre modèle et donc en déduire la distribution de flux intracellulaires chez chacune des souches. En analysant ces distributions nous avons mis en évidence un quasi constance du rendement éthanol mais une grande flexibilité de la voie des pentoses phosphate ainsi qu'un trade-off entre cette dernière et la synthèse d'acétate toutes les deux pourvoyeuses de la demande en NADPH. Enfin la structuration globale des flux semble se recouper avec l'origine des souches. Dans l'ensemble cette étude nous montre quelles sont les contraintes du réseau carboné central chez la levure en fermentation et nous donne des indices sur les meilleures cibles d'ingénierie génétique dans le but d'amélioration des souches.

VIRTUAL MITOCHONDRION A Modular and Multi Level Whole-Mitochondrion Model

Mazat Jean-Pierre ^{1*}, Ransac Stéphane, Nazaret Christine, Heiske Margit

1 : Institut de biochimie et génétique cellulaires (IBGC)

CNRS : UMR5095 Université Victor Segalen - Bordeaux II

1 Rue Camille Saint-Saens 33077 BORDEAUX CEDEX

<http://www.ibgc.u-bordeaux2.fr>

* : Auteur correspondant

Introduction and general aims

Mitochondria are vital organelles involved in ATP synthesis, NADH reoxidation, metabolites production, oxygen sensing, calcium signalling and ROS production. The general aim of our research project is to develop a whole-mitochondrion model able to capture the numerous aspects of this organelle's behaviour and their interactions.

Modelling strategy

Our modelling strategy is to study mitochondria at different level and to divide each level in different modules which are independently built, parameterized and individually tested. These models produce/use as inputs/outputs state variables such as amount of transcripts, enzyme activities, metabolites concentrations, ROS production, redox state etc. which are used to interface the modules together, constituting a super-module such as the respiratory chain assembled of respiratory complexes. A model of the super-module is obtained by assembling the elementary modules models, using common state variables. This method permits to test not only the individual models themselves operating together but also the way of their assembling (architecture of the system) and to jump on upper level of modelling.

Finally the Super-models are assembled to build a whole-mitochondrion model.

Properties and benefits of a whole-mitochondrion model.

Our whole-mitochondrion model will attempt to: (1) describe the simultaneous occurrence of fundamentally different mitochondrial processes (mtDNA replication, transcription and traduction, mtproteins import, phospholipids import and shared with reticulum, energization), (2) quantitatively describe the mitochondrial metabolic fluxes and their regulation and interaction with cell metabolism, (3) accurately predict a wide range of observable mitochondrial behaviour (apoptosis, mitophagy, fusion/fission), (4) give a better understanding of mitochondrial dysfunctions reported in mitochondrial diseases and help find ameliorative therapies (5) help to design synthetic circuits to incorporate into mitochondria and study their effects on the host mitochondrion, (6) assist in the design of various types of synthetic mitochondria for different purposes: clearance of lactic acid, maintain of redox state, ATP synthesis etc.

GUBS, a compilation framework for synthetic biology using behavioural specification

Basso-Blandin Adrien¹, Delaplace Franck¹

1 : Informatique, Biologie Intégrative et Systèmes Complexes (IBISC)

Université d'Evry-Val d'Essonne : EA4526

IBGBI - 23, boulevard de France - 91037 Evry

<http://www.ibisc.univ-evry.fr/>

The field of synthetic biology is looking forward principles and tools to make the biological devices inter-operable and programmable with, as long-term goal, the design of de-novo synthetic genome. In this endeavour, computer-aided-design (CAD) environments play a central role by providing the required features to engineer systems: specification, analysis, and tuning. The specification of a device is based on a programming language.

High level programming language for synthetic biology is announced as a key milestone for the second wave of synthetic biology to overcome the complexity of such large synthetic system design. We develop a domain specific language for synthetic biology dedicated to the behavioural specification, called GUBS (Genetic Unified Behavioural Specification). A GUBS program specifies the behaviour of the biological function.

The compiler of GUBS, GGC (GUBS Genetic Compiler) automatically selects biological components in order to build a device fulfilling to the behavioural specification.

Technically, the behavioural matching algorithm is based on ACI-Unification coupled to an evolutionary algorithm for selecting components in large database. The denotational semantics of GUBS interprets a program as a hybrid logic formula. The compilation principles of GGC are defined by a formal system.

A prototype written in OCAML has been developed and currently tested.

De la microélectronique à la biologie synthétique : vers un flot de conception assisté.

Gendrault Yves ^{1*}, Madec Morgan ^{2*}, Lallement Christophe ², Haiech Jacques ³

1 : Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie (ICube)

ECAM Strasbourg-Europe

300 bd Sébastien Brant - BP 10413 - F-67412 Illkirch Cedex

<http://icube.unistra.fr/>

2 : Laboratoire des sciences de l'ingénieur, de l'informatique et de l'imagerie (ICube)

université de Strasbourg

300 bd Sébastien Brant - BP 10413 - F-67412 Illkirch Cedex

<http://icube.unistra.fr/>

3 : Laboratoire d'Innovation Thérapeutique (LIT)

université de Strasbourg CNRS : UMR7200

Université de Strasbourg Faculté de Pharmacie 74 route du Rhin BP 60024 67401 Illkirch Cedex

* : Auteur correspondant

A partir d'une approche visant à réutiliser les outils existants en microélectronique tout en les adaptant au matériel biologique, notre équipe s'est attelée à recréer un environnement de conception assistée dédié à la biologie synthétique. Pour atteindre ce but, nous nous sommes basés sur des analogies entre les éléments standardisés de la biologie synthétique, les BioBriques, et les composants élémentaires de l'électronique numérique. Notre équipe s'est ainsi focalisée sur la modélisation des mécanismes biologiques à l'aide de langages de description matérielle utilisés en microélectronique, comme le VHDL-AMS et le SystemC-AMS. A partir d'une description comportementale servant de cible, les outils développés nous permettent de générer de manière automatique un assemblage de BioBriques se rapprochant le plus de cette description. Cette étape repose sur une modélisation logique (ou haut-niveau) des mécanismes biologiques et des algorithmes de synthèse logique intégrés aux outils standards utilisés en microélectronique. Le biosystème ainsi obtenu est ensuite modélisé à l'aide d'équations différentielles ordinaires et simulé également avec des outils propres à la microélectronique ou à la biologie, comme COPASI, afin de vérifier l'exactitude de son fonctionnement. Pour faire le lien entre ces deux types de modèles, nous avons également développé des modèles en logique floue, qui permettent une sélection plus fine des assemblages de BioBriques possibles dans la phase de conception. Ces modèles sont intégrés dans les différentes étapes du flot de conception développé.

Towards the virtual chloroplast

Curien Gilles ¹, Gloaguen Pauline ², Bournais Sylvain ², Christophe Bruley ², Tardiff Marianne ², Finazzi Giovanni ¹, Vandembrouck Yves ², Ferro Myriam ², Rolland Norbert ¹

1 : Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Végétale (CNRS, UMR 5168, CEA, DSV, iRTSV) (LPCV)

CNRS : UMR5168

17 avenue des Martyrs

2 : Exploring the Dynamics of Proteomes (EDyP), BGE/U1038, INSERM/CEA/Université Grenoble Alpes (EdyP)

Inserm : U1038Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) - GrenobleUniversité Joseph Fourier - Grenoble I
17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble

The chloroplast produces a high number of metabolites of industrial interest (sugars, vitamins, lipids, pigments, secondary metabolites). Success of metabolic engineering by synthetic biology approaches relies on detailed analytical kinetic modelling (1,2) of metabolic systems. Current knowledge of the plastidial metabolism is still dispersed in the scientific literature and databases are not designed for kinetic modelling. Thus we decided to create a virtual chloroplast. To this purpose we started to build a knowledge base (a chloroplast atlas named ChloroKB) to structure qualitative and quantitative data currently available. ChloroKB will contain a user-friendly interface allowing rapid visualization of the molecular actors. This will correspond to a snapshot of the entire chloroplast metabolism that will be used as a reference state for subsequent dynamic modelling. We built a series of metabolic maps of the Arabidopsis chloroplast using the software CellDesigner. These maps have then been integrated into a web interface providing direct links with biological and bibliographical databanks and enabling the access to semi-quantitative data on protein abundance obtained from the AT_CHLORO database (3), a public resource dedicated to the sub-plastidial localization of proteins. Each component of a given map is linked to their description page. Every map is connected with each other to follow a metabolite from one metabolism to another.

These maps are already extremely useful for deep curation and for sharing knowledge as well. Graphical data representation and visualization functionalities allow to directly pinpoint the metabolic steps that still need to be characterized at the protein level and provides a better understanding of the links between different metabolisms. A first release of this knowledge base available to the community is expected by the end of 2014.

1. Curien G et al. (2009) Understanding the regulation of aspartate metabolism with a model based on measured kinetic parameters. *Mol Syst Biol* 5, 271

2. Curien G et al. (2014) Analytical Kinetic Modeling: A Practical Procedure. *Methods Mol. Biol.* 1090, 261

3. Ferro et al. (2010). AT_CHLORO, a Comprehensive Chloroplast Proteome Database with Subplastidial Localization and Curated Information on Envelope Proteins. *Mol. Cell Prot.* 9: 1063

Location-location-location : the importance of space for intracellular cell biochemistry

Berry Hugues ^{1*}

1 : BEAGLE (Insa Lyon / INRIA Grenoble Rhône-Alpes / UCBL)

INRIA Institut National des Sciences Appliquées [INSA] - Lyon Université Claude Bernard - Lyon I

Antenne INRIA Lyon la Doua Bâtiment CEI-1 66 Boulevard Niels Bohr 69603 Villeurbanne

* : Auteur correspondant

Because the molecules in cells interact only when they meet, the way by which they actually move may have deep impact on the inner life of the cell. More often than not, we neglect this issue by considering that cell biochemical and signaling pathways are static objects with no real spatial extent. Experimental as well as most modeling approaches thus rely on mean-field equations («mass-action laws») which assume that intracellular spaces are diluted, perfectly stirred and spatially homogeneous. However, single-cell (and sometimes single tracker) experiments consistently report that diffusion in most intracellular compartments (membranes, cytoplasm, nucleus) is anomalous (i.e. not Brownian) because of macromolecular crowding and spatially inhomogeneous (i.e. motion properties depend on the location). In this talk, I will present investigations of the effects of spatial properties on some elementary biochemical/signaling modules including ligand-receptor binding, enzyme kinetics, elementary transcription networks and protein aggregation.

Synthetic-Natural pathways dialogue: Oxysterols pathways conception in yeast

Lautier Thomas ^{1*}, Truan Gilles ¹, Pompon Denis ¹

¹ : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA]CNRS : UMR5504 Institut National de la Recherche Agronomique - INRA

135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

www.lisbp.fr

* : Auteur correspondant

This work aims at constructing combinatorial metabolic libraries for the reconstruction in yeast of artificial metabolic pathways with a specific focus on triterpenoids pharmaceuticals. Functional characterization of clones expressing alternate gene combinations will allow analysis of the relationship between gene associations and related synthetic metabolisms and finally biosynthesis optimization in a parallel manner. This approach will be used to sort-out alternate set of heterologous genes required to rebuild given secondary metabolisms or alternatively to use the combinatorial to generate collections of molecules from a given metabolic root.

The approach is primary focused on ganoderic acids, produced by the fungus *Ganoderma lucidum*, Lingzhi, traditionally use in Chinese medicine. The ganoderic acids are a family of triterpene compounds for which a large range of potential therapeutic activities have been proposed (Xu et al., 2010). They belong to the oxysterols family, which the physiological and pharmacological role are extensively study. Several genomes of *Ganoderma lucidum* isolates have been recently published and the approach has started with validation of the expression in the yeast of genes candidates identified by bioinformatics analysis. P450 monooxygenases gene families, which catalyzed hydroxylations, the main functionalization of the ganoderics acids, have been first targeted for participation to this biosynthesis by combining in silico and experimental methods. Enzymatic assays in vitro and in vivo are currently done to validate in silico candidates and to definite efficient enzymatic association. Combinations giving rise to formation of different oxysterols of potential pharmaceutical interest will be analyzed in collaboration with pharmacologist partners.

Ex nihilo Design of a Synthetic Metabolic Pathway for the Production of 2,4-Dihydroxybutyric Acid

Walther Thomas^{1,2}, Topham Christopher², Irague Romain¹, Auriol Clément¹, Dressaire Clémentine¹, Baylac Audrey¹, Cordier Hélène¹, André Isabelle², Remaud-Simeon Magali², François Jean Marie²

1 : Toulouse White Biotechnology (TWB)

Institut National de la Recherche Agronomique - INRA Institut National des Sciences Appliquées (INSA) - Toulouse Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS

3, rue des Satellites 31400 Toulouse

2 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA] Institut National de la Recherche Agronomique - INRA Centre National de la Recherche Scientifique - CNRS

135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

2,4-Dihydroxybutyric acid (DHB) is a molecule with considerable potential as a versatile chemical synthon. Notably, it may serve as a precursor for chemical synthesis of the methionine analogue 2-hydroxy-4-(methylthio)butyrate, thus, targeting a considerable market in animal nutrition. However, petrochemical synthesis of DHB is not economically viable, and no natural metabolic pathways exist for the biochemical production of DHB. We have therefore conceived a three-step metabolic pathway for the synthesis of DHB starting from the natural metabolite malate. The pathway employs hitherto unreported malate kinase, malate semialdehyde dehydrogenase and malate semialdehyde reductase catalytic enzyme activities. The kinase and semialdehyde dehydrogenase activities were obtained by rational design based on structural and mechanistic knowledge of candidate enzymes acting on sterically similar cognate substrates. Malate semialdehyde reductase activity was identified from an initial screening of several natural enzymes, and was further improved by rational design. The pathway was expressed in a genetically optimised *Escherichia coli* strain, and zymotic production of DHB has been demonstrated.

Design et installation par évolution dirigée d'une voie alternative de biosynthèse des composés C1 chez *Escherichia coli* : le cycle du HOB

Bouzon Bloch Madeleine¹, Perret Alain¹, Loreau Olivier², Taran Frédéric², Weissenbach Jean¹, Marlière Philippe³

- 1 : Génomique métabolique (UMR 8030)
CEACNRS : UMR8030 Université d'Evry-Val d'Essonne
GENOSCOPE, 2 rue Gaston Crémieux 91057 Evry Cedex
<http://www.genoscope.cns.fr/spip/UMR-8030-de-Genomique-metabolique.html>
- 2 : CEA - iBiTecS - SCBM
CEA
91191 Gif-sur-Yvette
- 3 : Heurisko USA Inc.
Delaware

Nous avons conçu une voie alternative pour la biosynthèse du méthylène-tétrahydrofolate, intermédiaire métabolique universellement utilisé pour former les composés C1, méthionine, nucléotides puriques, thymidylate et déhydropantoate. Cette voie nouvelle substitue le composé non naturel 4-hydroxy-2-keto-butyrat (HOB) aux donneurs canoniques de C1, sérine et glycine, et implique deux nouvelles activités enzymatiques, la transamination de la L-homosérine en HOB et le clivage du HOB pour former pyruvate et méthylène-tétrahydrofolate.

Cette voie synthétique a été installée dans une souche d'*E. coli* dépourvue des gènes codant pour l'activité sérine hydroxyméthyltransférase et pour le complexe de dégradation de la glycine et requérant en conséquence l'ajout des métabolites C1 dans le milieu de culture. Ces bactéries auxotrophes ont été soumises à deux protocoles successifs d'évolution dirigée *in vivo*. Après environ 900 générations cellulaires, des bactéries mutantes prototrophes ont été obtenues et isolées. L'analyse des mutations sélectionnées dans le génome des bactéries prototrophes a permis d'identifier les gènes susceptibles de coder les activités enzymatiques impliquées dans la nouvelle voie métabolique. Les activités L-homosérine transaminase et HOB-hydroxyméthyltransférase ont été caractérisées et les paramètres cinétiques des enzymes déterminés. Ces résultats associés à ceux d'expériences génétiques et métaboliques *in vivo* établissent le fonctionnement de la voie des C1 dépendant du HOB.

La L-homosérine a comme précurseur l'oxaloacétate, issu chez *E. coli* de la carboxylation du phosphoénolpyruvate. En conséquence, nos bactéries, qui utilisent le HOB comme unique donneur de C1, fixent, réduisent et assimilent le CO₂ par un cycle métabolique jamais décrit dans un organisme naturel.

Cupriavidus necator : plateforme de bioproduction de synthons

Grousseau Estelle ¹, Lu Jingnan ^{,2}, Gorret Nathalie ¹, Guillouet Stéphane ^{1*}, Sinsky Anthony ^{,2}

1 : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

Institut National des Sciences Appliquées [INSA] Institut national de la recherche agronomique (INRA) : UMR792CNRS : UMR5504
135 Avenue de rangueil 31077 Toulouse cedex 04

2 : Massachusetts Institute of Technology (MIT)

77 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA, 02139

* : Auteur correspondant

Dans le contexte actuel, il est nécessaire de réduire la consommation de produits issus du pétrole et de développer des carburants et intermédiaires chimiques issus de ressources renouvelables. *Cupriavidus necator* est un microorganisme capable d'assimiler de nombreuses sources de carbones simples et complexes, notamment des huiles, des acides gras, ou encore du dioxyde de carbone (CO₂), qui peuvent être issues de flux de déchets agro-industriels. *C. necator* est un microorganisme utilisé à l'échelle industrielle pour la production de biopolymères de type polyhydroxyalcanoates (PHA). *C. necator* présente donc un fort potentiel en tant que plateforme de production de molécules d'intérêt et plus particulièrement pour des molécules ayant comme précurseurs des intermédiaires de la voie de synthèse des PHA.

Dans ces travaux, une approche, associant génie métabolique, modélisation métabolique et génie microbiologique, a été mise en oeuvre pour rediriger le flux de carbone du poly-3-hydroxybutyrate (P(3HB)) vers la production de biocarburants ou d'intermédiaires chimiques. Les différentes étapes mises en oeuvre ont été :

- l'identification des molécules cibles
- l'évaluation *in silico* des voies de production par modélisation stoechiométrique tenant notamment compte des besoins en cofacteurs (NADH ou NADPH) et en énergie associés à chaque voie
- la construction des souches les plus pertinentes d'après la modélisation, et intégrant des éléments de régulation au niveau transcriptionnel et traductionnel
- l'évaluation des souches en fiole d'erlenmeyer en mode batch
- la caractérisation de la meilleure souche productrice en bioréacteur en mode fed-batch

Cette démarche a notamment permis de produire de l'isopropanol avec la souche Re2133/pEG7c [1] à une concentration de plus de 10 g/L en bioréacteur, avec des performances qui se situent à plus de 60% des performances théoriques limites (rendement et vitesse spécifique de production) sans altération de la croissance.

[1] Grousseau et al., AMB, 2014 , 98(9):4277-90. doi: 10.1007/s00253-014-5591-0

Development of an absolute and multiplex MS-based quantification method for E. coli carbon central metabolism proteins: a tool to feed dynamic predictive models

Ferro Myriam ¹, Trauchessec Mathieu ¹, Jaquinod Michel ¹, Brun Virginie ¹, Bruley Christophe ¹, De Jong Hidde ², Roppers Delphine ², Garin Jérôme ¹, Bestel-Corre Gwénaëlle ³

1 : Exploring the Dynamics of Proteomes (EDyP), BGE/U1038, INSERM/CEA/Université Grenoble Alpes (EdyP)

Inserm Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives (CEA) - Grenoble Université Joseph Fourier - Grenoble I
17 rue des Martyrs, F-38054 Grenoble

2 : Equipe IBIS INRIA/Grenoble (IBIS)

INRIA Université Grenoble Alpes
St Ismier

3 : Metabolic Explorer (Metex)

Société privée
Biopole Clermont-Limagne 63360 Saint-Beauzire

Green chemistry aims at designing and inventing the next generation of daily products by reducing or eliminating the use of fossil resources. The strategy consists in developing high-performance production strains using biomolecular engineering and metabolic network models. Metabolic network models allow absolute fluxes through larger networks of central carbon metabolism to be determined. However, these stoichiometric based-models only set aside static prediction. To obtain dynamic prediction models, quantitative «omics» data must be integrated into a systems-oriented framework together with enzymology data. The challenge of the present study is to obtain highly accurate absolute quantification of dozen of proteins in a single SRM analysis without any decomplexification for modelling purposes.

To accurately quantify protein, we used the PSAQ strategy (Brun et al., 2007; Protein standard Absolute Quantification), based on full length isotope labelled protein, which was described as being the most accurate. In order to quantify E. coli carbon central metabolism proteins, full length ¹⁵N isotopically labelled protein were produced. In addition, mass spectrometry using the scheduled SRM (scSRM) mode was chosen to accurately and specifically quantify proteins in E.coli lysates.

The assay was applied to obtain accurate quantification of 22 key enzymes of central metabolism, resulting to more than 720 transitions monitored during a single LC-SRM run. Using this workflow, we investigated two E.coli strains genetically modified to induce an increased NADPH/NADP⁺ ratio (Auriol et al, 2011). Thus accurate enzyme concentrations were determined and used in fluxes models particularly to assess the levels of regulation of some metabolic reactions.

With such an accurate quantification method, it becomes possible to obtain enough quantitative proteomics data of different E. coli strains for providing dynamic prediction models with accurate measurements.

Combinatorial approach for expression level modulation of a multigene pathway: what effects can we really expect?

Carquet Marie¹, Truan Gilles¹, Pompon Denis¹

¹ : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)

CNRS : UMR5504INSA - Institut National des Sciences Appliquées Institut national de la recherche agronomique (INRA)

INSA Toulouse 135 Avenue de Rangueil 31077 Toulouse Cedex 4

www.lisbp.fr

Microorganisms are widely used in biotechnologies as microbial factories for the sustainable production of value-added molecules. Those heterologous hosts are engineered with synthetic biology approaches aiming to design and implement the transposition of full natural or artificial synthetic pathways.

It is known that unregulated expression of foreign enzymes can be toxic to the host, in relation with metabolic burden, overconsumption of resources, or accumulation of toxic intermediates. One way to control such imbalances is to regulate separately the expression level of each metabolic step within the biosynthetic pathway. This goal can be achieved at the transcriptional level by varying promoter's strength in front of each gene.

Among the panel of available microorganisms for metabolic engineering, *Saccharomyces cerevisiae* is widely used. In this host, a list of constitutive promoters is available, associated with their assumed strength in their natural configuration. In the context of metabolic engineering, authors generally presume that they can expect an expression level that would reflect the strength of the considered promoter, regardless of the open reading frame put under the promoter's control. But, how can we rely on data obtained by measuring expression level of one model gene, while, as it is the case in metabolic engineering projects, we aim to regulate the flux in a multiple gene pathway, associated with unknown regulation mechanisms?

To answer this question, we performed analysis at the transcripts and metabolite levels on strains expressing the zeaxanthin biosynthesis pathway. The three genes involved were put under the control of a set of three constitutive promoters of *Saccharomyces cerevisiae*, assembled in a combinatorial manner.

The resulting 14 strains are currently examined by RT-qPCR and by quantifying the generated products.

Biosynthèse de nouveaux analogues de pyrrolamides par biosynthèse combinatoire et mutasynthèse

Lautru Sylvie ^{1*}, Vingadassalon Audrey ¹, Lorieux Florence ¹, Le Goff Géraldine ², Pernodet Jean-Luc ¹

1 : Institut de génétique et microbiologie (IGM)

CNRS : UMR8621 Université Paris XI - Paris Sud

bat. 400 -409 -360 15, rue Georges Clémenceau 91405 ORSAY CEDEX

<http://www.igmors.u-psud.fr>

2 : Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN)

CNRS : UPR2301

Avenue de la terrasse 91198 Gif sur yvette cedex

* : Auteur correspondant

Les pyrrolamides constituent une famille des produits naturels fabriqués par des Streptomyces et des actinobactéries apparentées. Leur capacité à se lier dans le petit sillon de l'ADN leur confère un grand nombre d'activités biologiques, telles que des activités antimicrobiennes ou antitumorales. En 2009, nous avons isolé et caractérisé le premier groupe de gènes dirigeant la biosynthèse d'un pyrrolamide, le groupe de gène de biosynthèse de la congocidine chez Streptomyces ambofaciens. Une approche combinant génétique moléculaire et de chimie analytique nous a permis d'identifier les précurseurs de la congocidine et de proposer des voies de biosynthèse pour ces précurseurs, voies toutes sans précédent dans la littérature. Poursuivant notre travail sur les pyrrolamides, nous avons récemment étudié la souche Streptomyces netropsis DSM40843, connue pour produire la distamycine. Nous avons montré que cette souche produit également de la congocidine et un hybride congocidine/distamycine que nous avons appelé disgocidine. L'isolement des gènes impliqués dans la biosynthèse de ces molécules a montré l'existence de deux groupes de gènes, tous deux nécessaires pour la synthèse de chacun des trois pyrrolamides. L'analyse de ces gènes nous a permis de proposer une voie de biosynthèse pour la congocidine et la distamycine. Elle a également indiqué que la biosynthèse de la disgocidine résulte d'une biosynthèse combinatoire naturelle (combinaison d'enzymes de différentes voies). Tirant profit de la flexibilité de ces systèmes biosynthétiques, nous développons actuellement une approche de biosynthèse combinatoire et de mutasynthèse pour synthétiser de nouveaux dérivés de pyrrolamides. Deux analogues de la congocidine ont déjà été obtenus.

Atelier de réflexion : Enjeux sociétaux de la biologie synthétique

Mekki-Dauriac Soraya ¹, Cambon-Thomsen Anne ², Desbois Simon ³

- 1 : Génopole Toulouse Midi-Pyrénées [Auzeville] (GENOTOUL)
Université Paul Sabatier (UPS) - Toulouse IIIInserm
Chemin de Borde-Rouge Auzeville
- 2 : UMR 1027, Inserm, Univ Toulouse III - Paul Sabatier
Université Toulouse III - Paul Sabatier - IUT de Tarbes
37 allées Jules Guesde F-31000 Toulouse
- 3 : Génopole Toulouse Midi-Pyrénées [Auzeville] (GENOTOUL)
Université Paul Sabatier (UPS) - Toulouse IIIInserm
Chemin de Borde-Rouge Auzeville
<http://societal.genotoul.fr>

Courant 2010, la biologie de synthèse fait l'objet de «une» dans des journaux scientifiques¹. A la suite de quoi, les médias utilisent des titres accrocheurs sur la création de la vie, et suscitent ainsi un débat animé, entre craintes et espoirs. Et ce, d'autant plus que le champ de cette biologie, dont la complexité peut être révélatrice des enjeux, est peu défini. Dans ce contexte, la plateforme sociétale de la génopole® Toulouse Midi-Pyrénées -dont l'une des missions est de promouvoir une réflexion éclairée et le débat public-s'est intéressée aux enjeux sociétaux dans le cadre de ses ateliers 2011 et 2014².

En 2011, dans un premier volet, nous avons tenté de définir la biologie de synthèse et ses contours, puis évoqué ses principaux enjeux éthiques, en nous appuyant sur l'avis du groupe européen d'éthique des sciences et des nouvelles technologies, premier avis d'une instance d'éthique des sciences sur ce sujet³. Lors de la session suivante, nous nous sommes interrogés sur les enjeux socioéconomiques de la biologie de synthèse. Est-ce une démarche de construction aux effets attendus ? A l'inverse, est-elle susceptible de faire émerger des résultats nouveaux et imprévisibles ? S'agit-il d'un saut technologique réel ou d'effets d'annonce destinés à mobiliser de quoi financer la recherche ? Le troisième volet a consisté à aborder les enjeux philosophiques et de communication autour de la biologie de synthèse, à travers une réflexion autour du vivant et sur ce qu'avait réalisé l'équipe de Craig Venter¹.

Les réflexions menées dans le cadre de cet atelier 2011 permet d'affirmer que nous assistons à un changement de culture et de supposer que cette «fabrique du vivant», pourtant porteuse d'espoirs, aura des impacts à considérer sur les écosystèmes, les populations humaines et sur l'évolution biologique. Ces réflexions donnent actuellement lieu à la rédaction d'une synthèse destinée à une publication.

Les trois volets de l'atelier 2014 (enjeux écologiques et sanitaires de la biologie de synthèse, frontières du naturel et de l'artificiel, enjeux des débats autour de cette discipline émergente) ont alimenté et actualisé ces réflexions. Une synthèse en cours d'élaboration permettra d'en rendre compte.

Index des auteurs

André, Isabelle.....	64
Arnaud, Julie.....	7
Artiguenave, Francois.....	24
Audfray, Aymeric.....	7
Auriol, Clément.....	64
Aymerich, Stéphane.....	5
Basso-Blandin, Adrien.....	59
Bastard, Karine.....	24
Batoux, Martine.....	39
Baylac, Audrey.....	64
Becher, Dörte.....	14
Belin, Pascal.....	8
Bellvert, Floriant.....	50, 51
Berry, Hugues.....	62
Bertin, Marine.....	34
Bertrand-Michel, Justine.....	50
Bestel-Corre, Gwénaëlle.....	67
Bichara, Marc.....	44
Bigey, Frédéric.....	40
Blanchard, Alain.....	16
Bonnet, Jerome.....	3, 25, 41
Borkowski, Olivier.....	5
Boschi-Muller, Sandrine.....	45
Bouet, Jean-Yves.....	15
Bournais, Sylvain.....	61
Bouzon Bloch, Madeleine.....	65
Bouzon, Madeleine.....	55
Brial, Pascale.....	57
Bruley, Christophe.....	67
Brun, Virginie.....	67
Bruyninx, Marc.....	21
Burnouf, Dominique.....	44
Cadière, Axelle.....	40
Cahoreau, Edern.....	51
Camarasa, Carole.....	40, 57
Cambon-Thomsen, Anne.....	70
Carbonell, Pablo.....	2
Carpousis, Agamemnon.....	54

Carquet, Marie.....	68
Cattoni, Diego.....	15
Celton, Magalie.....	40
Chevrel, Anne.....	9
Christophe, Bruley.....	61
Cocaign-Bousquet, Muriel.....	52, 53, 54
Consortium, The Basynthec.....	22
Cordier, Hélène.....	64
Coudreuse, Damien.....	4
Courbet, Alexis.....	25
Cournac, Axel.....	43
Curien, Gilles.....	61
Daignan-Fornier, Bertrand.....	13
Danoun, Saïda.....	50
Dausse, Eric.....	56
De Berardinis, Veronique.....	24
De Jong, Hidde.....	28, 67
Debrauwer, Laurent.....	50
Declerck, Nathalie.....	41
Delacote, Fabien.....	18
Delaplace, Franck.....	59
Delebecque, Camille.....	23
Dequin, Sylvie.....	40, 57
Dervyn, Etienne.....	14
Desbois, Simon.....	70
Desmadril, Michel.....	9
Dion, Michel.....	48
Dischert, Wanda.....	32
Doring, Volker.....	55
Dressaire, Clémentine.....	64
Dumas, Philippe.....	44
Durand, Guillaume.....	56
Endy, Drew.....	25
Enjalbert, Brice.....	52
Esquerré, Thomas.....	54
Fatemi, Fataneh.....	6
Faulon, Jean-Loup.....	2
Favry, Emmanuel.....	8

Feher, Tamas.....	2
Ferro, Myriam.....	61, 67
Fichant, Gwennaële.....	12
Finazzi, Giovanni.....	61
Flot, Jean-Francois.....	43
Frances, Oriane.....	6
François, Jean Marie.....	42, 64
Fromion, Vincent.....	5, 14, 27
Gai, Claudia.....	33
Gales, Lara.....	51
Galy, Olivier.....	10
Galzi, Jean-Luc.....	29
Garin, Jérôme.....	67
Gasc, Cyrielle.....	15
Gauquelin, Charles.....	46
Gendrault, Yves.....	60
Giardina, Thierry.....	47
Girbal, Laurence.....	53, 54
Gloaguen, Pauline.....	61
Goelzer, Anne.....	5
Gondry, Muriel.....	8
Gorret, Nathalie.....	66
Grousseau, Estelle.....	66
Grégoire-Delory, Vincent.....	37
Guedich, Sondes.....	44
Gueroui, Zoher.....	26
Guillouet, Stéphane.....	66
Guttet, Eric.....	6
Guiziou, Sarah.....	41
Haiech, Jacques.....	60
Hatzimanikatis, Vassily.....	53
Heiske, Margit.....	58
Hendrickx, Johann.....	48
Henry, Christopher S.....	22
Hoffmann, Lionel.....	48
Imberty, Anne.....	7
Irague, Romain.....	64
Jacques, Isabelle.....	8

Jaquinod, Michel.....	67
Jules, Matthieu.....	5
Koszul, Romain.....	43
Kulyk-Barbier, Hanna.....	51
Laguerre, Sandrine.....	54
Lallement, Christophe.....	60
Lartigue, Carole.....	20
Lautier, Thomas.....	63
Lautru, Sylvie.....	69
Le Goff, Géraldine.....	69
Le Gouellec, Audrey.....	19
Le Monnier, Elodie.....	41
Legras, Jean-Luc.....	57
Lescop, Ewen.....	6
Libis, Vincent.....	2
Loreau, Olivier.....	65
Lorieux, Florence.....	69
Lu, Jingnan.....	66
Létisse, Fabien.....	52
Madec, Morgan.....	60
Magnin, Thierry.....	35
Mangan, Michael.....	22
Marbouty, Martial.....	43
Marie-Nelly, Herve.....	43
Marlière, Philippe.....	55, 65
Mazat, Jean-Pierre.....	58
Mekki-Dauriac, Soraya.....	70
Mesneau, Agnes.....	9
Meynial-Salles, Isabelle.....	33, 46
Minard, Philippe.....	9
Miquel, Paul-Antoine.....	36
Molina, Franck.....	25
Moretto, Fabien.....	13
Morin, Manon.....	52
Moutiez, Mireille.....	8
Mozziconacci, Julien.....	43
Muller, Heloise.....	17
Mutzel, Rupert.....	55

Mäder, Ulrike.....	5, 14
Médigue, Claudine.....	24
Nazaret, Christine.....	58
Nicolas, Pierre.....	14
Nidelet, Thibault.....	57
Noiro, Philippe.....	14, 22
Nollmann, Marcelo.....	15
Offmann, Bernard.....	48
Paques, Frédéric.....	31
Parmeggiani, Andrea.....	15
Parrou, Jean Luc.....	42
Patrouix, Julien.....	55
Perez, Javier.....	6
Pernodet, Jean-Luc.....	69
Perret, Alain.....	65
Petitjean, Marjorie.....	42
Peyriga, Lindsay.....	50, 51
Peyrin, Eric.....	56
Picard, Flora.....	53
Pinson, Benoit.....	13
Polack, Benoit.....	19
Polard, Patrice.....	12
Pompon, Denis.....	6, 63, 68
Portais, Jean-Charles.....	50, 51, 52
Prudhomme, Marc.....	12
Racle, Julien.....	53
Ransac, Stéphane.....	58
Ravelet, Corinne.....	56
Rech, Jérôme.....	15
Remaud-Simeon, Magali.....	64
Rolland, Norbert.....	61
Ropers, Delphine.....	52
Roppers, Delphine.....	67
Römer, Winfried.....	7
Salanoubat, Marcel.....	24
Sanchez, Aurore.....	15
Sanchez, Isabelle.....	57
Schaeffer, Marc.....	5

Seguin, Jérôme.....	8
Sinsky, Anthony.....	66
Sizun, Cristina.....	6
Skinner, Nigel.....	38
Smith, Alexander.....	24
Sokol, Serguei.....	51
Soucaille, Philippe.....	30, 33, 46
Talfournier, François.....	45
Tanaka, Kosei.....	22
Taran, Frédéric.....	65
Tardiff, Marianne.....	61
Tellier, Charles.....	48
Thomas, Daniel.....	33
Tian, Liang.....	33
Tilloy, Valentin.....	40
Tissot-Dupont, Jeremy.....	13
Tolonen, Andrew.....	49
Topham, Christopher.....	64
Toulme, Jean-Jacques.....	56
Toulouse, Igem.....	11
Toussaint, Bertrand.....	19
Trauchessec, Mathieu.....	67
Truan, Gilles.....	6, 63, 68
Turlan, Catherine.....	54
Urvoas, Agathe.....	9
Valerio, Marielle.....	9
Vallenet, David.....	24
Vandenbrouck, Yves.....	61
Vax, Amelie.....	42
Vergne-Vaxelaire, Carine.....	24
Vingadassalon, Audrey.....	69
Walter, Jean-Charles.....	15
Walter, Philippe.....	44
Walther, Thomas.....	42, 64
Weissenbach, Jean.....	1, 24, 55, 65
Weyder, Mathias.....	12

Liste des auteurs

Adrien Basso-Blandin	abasso@ibisc.univ-evry.fr
Martine Batoux	Martine.BATOUX@agencerecherche.fr
Florian Bellvert	bellvert@insa-toulouse.fr
Hugues Berry	hugues.berry@inria.fr
Marine Bertin	Marine.Bertin@sanofi.com
Alain Blanchard	ablancha@u-bordeaux2.fr
Jerome Bonnet	bonnet@cbs.cnrs.fr
Sandrine Boschi-Muller	sandrine.boschi@univ-lorraine.fr
Jean-Yves Bouet	jean-yves.bouet@ibcg.biotoul.fr
Bloch Bouzon	mbouzon@genoscope.cns.fr
Marc Bruyninx	MarcBruyninx@eurofins.com
Dominique Burnouf	d.burnouf@ibmc-cnrs.unistra.fr
Carole Camarasa	camarasa@supagro.inra.fr
Carole Camarasa	camarasa@supagro.inra.fr
Marie Carquet	marie.carquet@insa-toulouse.fr
Anne Chevrel	anne.chevrel@u-psud.fr
Muriel Cocaign-Bousquet	cocaign@insa-toulouse.fr
Damien Coudreuse	damien.coudreuse@univ-rennes1.fr
Alexis Courbet	alexis.courbet@sysdiag.cnrs.fr
Gilles Curien	gilles.curien@cea.fr
Bertrand Daignan-Fornier	b.daignan-fornier@ibgc.cnrs.fr
Jong De	Hidde.de-Jong@inria.fr
Fabien Delacote	fabien.delacote@collectis.com
Camille Delebecque	camille.delebecque@gmail.com
Etienne Dervyn	etienne.dervyn@jouy.inra.fr
Simon Desbois	desbois.simon@gmail.com
Michel Dion	michel.dion@univ-nantes.fr
Wanda Dischert	wdischert@metabolic-explorer.com
Volker Doring	vdoring@genoscope.cns.fr
Brice Enjalbert	brice.enjalbert@insa-toulouse.fr
Jean-Loup Faulon	jean-loup.faulon@issb.genopole.fr
Myriam Ferro	myriam.ferro@cea.fr
Gwennaële Fichant	fichant@ibcg.biotoul.fr
Jean François	fran_jm@insa-toulouse.fr
Vincent Fromion	vincent.fromion@jouy.inra.fr
Olivier Galy	ogaly@insa-toulouse.fr
Jean-Luc Galzi	galzi@unistra.fr
Charles Gauquelin	gauqueli@insa-toulouse.fr
Yves Gendrault	ygendrault@unistra.fr
Thierry Giardina	thierry.giardina@univ-amu.fr
Laurence Girbal	girbal@insa-toulouse.fr
Muriel Gondry	muriel.gondry@cea.fr
Vincent Grégoire-Delory	vgd@ict-toulouse.fr
Estelle Grousseau	estelle.grousseau@insa-toulouse.fr
Zoher Gueroui	zoher.gueroui@ens.fr
Sarah Guiziou	guiziou.sarah@gmail.com
Anne Imberty	imberty@cermav.cnrs.fr
Matthieu Jules	matthieu.jules@grignon.inra.fr
Romain Koszul	romain.koszul@pasteur.fr
Carole Lartigue	clartigu@bordeaux.inra.fr
Thomas Lautier	thomas.lautier@insa-toulouse.fr
Sylvie Lautru	sylvie.lautru@igmors.u-psud.fr
Thierry Magnin	tmagnin@univ-catholyon.fr
Jean-Pierre Mazat	jpm@u-bordeaux2.fr
Isabelle Meynial-Salles	meynial@insa-toulouse.fr
Paul-Antoine Miquel	pamiquel@univ-tlse2.fr
Heloise Muller	hmuller@pasteur.fr
Philippe Noirot	philippe.noirot@jouy.inra.fr
Frédéric Paques	info@global-bioenergies.com
Lindsay Peyriga	peyriga@insa-toulouse.fr
Marcel Salanoubat	salanou@genoscope.cns.fr
Nigel Skinner	nigel_skinner@agilent.com
Philippe Soucaille	soucaill@insa-toulouse.fr
Andrew Tolonen	atolonen@genoscope.cns.fr
Jean-Jacques Toulme	jean-jacques.toulme@inserm.fr
Igem Toulouse	igem.toulouse@gmail.com
Bertrand Toussaint	btoussaint@chu-grenoble.fr
Gilles Truan	Gilles.truan@insa-toulouse.fr
Thomas Walther	thomas.walther@insa-toulouse.fr
Jean Weissenbach	jsbach@genoscope.cns.fr